



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



MAGDALENA SILVA FARIAS LEAL

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AOS TESTES EM ANIMAIS: UMA  
ABORDAGEM *IN VITRO***

João Pessoa

2024

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

L435a Leal, Magdalena Silva Farias.

Avaliação de métodos alternativos aos testes em animais: uma abordagem in vitro / Magdalena Silva Farias Leal. - João Pessoa, 2024.

55 f. : il.

Orientação: Pablo Queiroz Lopes.

Coorientação: Yuri Mangueira do Nascimento.

TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Métodos alternativos. 2. Testes in vitro. 3. Bem-estar animal. 4. Legislação nacional. I. Lopes, Pablo Queiroz. II. Nascimento, Yuri Mangueira do. III. Título.

UFPB/CCS

CDU 616-092.4(043.2)

Magdalena Silva Farias Leal

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AOS TESTES EM ANIMAIS: UMA  
ABORDAGEM *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr<sup>o</sup> Pablo Queiroz Lopes

Coorientador: Dr<sup>o</sup> Yuri Manguiera do Nascimento

**João Pessoa**

**2024**

MAGDALENA SILVA FARIAS LEAL

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AOS TESTES EM ANIMAIS: UMA  
ABORDAGEM *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 15 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente  
 **PABLO QUEIROZ LOPES**  
Data: 25/10/2024 12:18:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Pablo Queiroz Lopes  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente  
 **YURI MANGUEIRA DO NASCIMENTO**  
Data: 25/10/2024 11:25:28-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Dr. Yuri Mangueira do Nascimento  
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Documento assinado digitalmente  
 **LEILA BASTOS LEAL**  
Data: 22/10/2024 14:20:09-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Leila Bastos Leal  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Documento assinado digitalmente  
 **SILVANA TERESA LACERDA JALES**  
Data: 22/10/2024 18:05:46-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Profa. Dra. Silvana Tereza Lacerda Jales  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Elisângela e Luís Helder, aos meus irmãos Antônio (o Luís e o Leal), e ao meu noivo Marcos Cipriano, bem como a toda a minha família, por todo apoio, carinho e amor e por me darem forças para superar as dificuldades da graduação e da vida, sempre me acompanhando, apoiando, e, principalmente, acreditando em mim.

Eu amo vocês, muito e sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço a Deus, cuja luz e sabedoria guiaram meus passos durante todo este percurso. Sem Sua força e inspiração, me concedendo saúde, conhecimento e a oportunidade de concluir esta etapa tão importante em minha vida, este trabalho não seria possível.

Aos meus pais, Elisângela e Luís Hélder, meu agradecimento mais profundo. Obrigado pelo amor incondicional, educação, apoio, investimento, abdições e por acreditarem em mim. Vocês me proporcionaram o privilégio de poder estudar e correr atrás do que eu queria. Também aos meus irmãos, Luís Antônio e Antônio Leal, e em geral a todos os meus familiares, por estarem ao meu lado, o que me ajudou a ser quem sou hoje.

Ao meu noivo (quase esposo), Marcos, por sua compreensão, companheirismo e por estar presente em todos os momentos, mesmo nos mais desafiadores que eu nem imaginava estar precisando de alguém. Você é o amor da minha vida, e, além de tornar a vida em geral mais leve, com certeza não conseguiria terminar esse processo com tranquilidade (pouca, mas muito melhor que nenhuma) se não fosse por você.

Aos meus amigos, Bianca, Vitória, Vinicius, Camylla, Vanessa e Bruno, que estiveram ao meu lado nos momentos de alegria e também nas dificuldades, agradeço pelas risadas, incentivo e compreensão. Cada um de vocês fez esta jornada mais leve e especial.

Agradeço à Professora Leila Leal pela sugestão do tema, que me permitiu explorar uma área tão relevante, que me fez chorar com os casos de crueldade que a ciência pode fazer e me aliar a causa de substituição dos testes em animais e de uma ciência menos cruel.

Por fim, aos meus professores, todos eles, especialmente Professor Pablo Queiroz, meu orientador, com quem tive a liberdade necessária de entender o que queria na graduação e foi de grande apoio, e a Yuri, meu coorientador, que caiu de paraquedas na minha vida e só pode ter sido enviado por Deus de tanto que ajudou. Sou eternamente grata pelo conhecimento compartilhado, pelas orientações valiosas e por acreditarem no meu potencial. Vocês foram fundamentais na minha formação.

A todos (e foram muitos) que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e aqui não foram citados:

Meus sinceros agradecimentos!

“Nem tudo que se enfrenta pode ser  
modificado, mas nada pode ser modificado  
até que seja enfrentado.”

**James Baldwin**

## RESUMO

A pesquisa com animais em testes de segurança de produtos cosméticos, farmacêuticos, de higiene pessoal e agrotóxicos tem sido alvo de diversos debates éticos e científicos. A crescente preocupação ética com o bem-estar animal, aliada aos avanços tecnológicos, tem impulsionado a busca por modelos experimentais que sejam mais precisos, rápidos e economicamente viáveis. Diante desse cenário, o desenvolvimento de métodos alternativos, como os testes *in vitro*, surge como uma promissora alternativa. Os métodos *in vitro* apresentam diversas vantagens em relação aos testes em animais, como maior reprodutibilidade, menor custo e menor sofrimento animal. No entanto, ainda existem desafios a serem superados, como a necessidade de padronização dos protocolos e a qualificação de profissionais. Diante disso, esta revisão sistemática analisou a literatura sobre a utilização de métodos *in vitro* no Brasil, com o objetivo de avaliar sua eficácia na substituição dos testes em animais e analisar como os pesquisadores nacionais estão utilizando dos métodos já reconhecidos nacionalmente. Os resultados demonstraram um crescente interesse e adoção desses métodos no país, com destaque para a avaliação de irritação cutânea e ocular, fototoxicidade e genotoxicidade. Os métodos alternativos representam uma ferramenta valiosa para a indústria cosmética e farmacêutica, contribuindo para o desenvolvimento de produtos mais seguros e éticos. A legislação brasileira tem avançado na direção de incentivar a adoção desses métodos, mas é fundamental que haja um contínuo investimento em pesquisa e desenvolvimento para aprimorar as metodologias existentes e criar novas alternativas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Métodos Alternativos; Testes *in vitro*; Bem-estar animal; Legislação nacional

## **ABSTRACT**

Animal testing in the safety assessment of cosmetics, pharmaceuticals, personal care products and pesticides has been the subject of numerous ethical and scientific debates. Growing ethical concerns about animal welfare, coupled with technological advancements, have driven the search for experimental models that are more precise, rapid, and cost-effective. In this context, the development of alternative methods, such as in vitro tests, emerges as a promising alternative. In vitro methods offer several advantages over animal testing, such as greater reproducibility, lower cost, and reduced animal suffering. However, there are still challenges to be overcome, such as the need for standardization of protocols and the qualification of professionals. In view of this, this systematic review analyzed the literature on the use of in vitro methods in Brazil, with the aim of assessing their effectiveness in replacing animal testing and analyzing how Brazilian researchers are using the methods already recognized nationally. The results demonstrated a growing interest and adoption of these methods in the country, with emphasis on the assessment of skin and eye irritation, phototoxicity, and genotoxicity. Alternative methods represent a valuable tool for the cosmetics and pharmaceutical industry, contributing to the development of safer and more ethical products. Brazilian legislation has been advancing towards encouraging the adoption of these methods, but it is essential that there be continuous investment in research and development to improve existing methodologies and create new alternatives.

**KEYWORDS:** Alternative methods; In vitro tests; Animal welfare; National legislation

## LISTA DE ABRAVIAÇÕES

**ABDI** – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial

**ACFB** – Academia de Ciências Farmacêuticas

**a.E.C** – antes da Era Comum

**ANF** – Academia Nacional de Farmácia

**BraCVAM** – Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

**BVS** – Biblioteca Virtual em Saúde

**CAFe** - Comunidade Acadêmica Federada

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**CONCEA** - Conselho Nacional de Experimentação Animal

**ECVAM** – *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

**GHS** – Sistema Globalmente Harmonizado

**hCE** – Epitélio da córnea humana

**hrER** - Receptor estrogênico humano recombinante

**HSI** – *Humane Society International*

**ICCVAM** - *Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods*

**INCQS** - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

**JACVAM** – *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*

**LD** - *letal dose* – dose letal

**OECD** – *Organization for Economic Cooperation and Development*; Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

**ONU** - Organização das Nações Unidas

**ReNaMa** – Rede Nacional de Métodos Alternativos

**RhE** – Epiderme Humana Reconstruída

**RIL** – Revisão Integrativa de Literatura

**RN** – Resolução Normativa

**TG** – *testing guide*; guia de teste

**ZEBET** – *Zentralstelle zur Erfassung/Bewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - ‘Save Ralph’ e coelho vítima de testagem de irritação ocular.....	21
<b>Figura 02</b> - Coelho após teste de irritação dermal.....	21
<b>Figura 03</b> - Cães inalando substâncias para testes.....	22
<b>Figura 04</b> - Fluxograma da seleção de artigos a cada etapa de verificação dos critérios de inclusão/exclusão .....	36
<b>Figura 05</b> - O Brasil no mundo – Dados ao Consumidor – 2023.....	43

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01</b> - Métodos alternativos validados reconhecidos no Brasil, Resoluções Normativas e desfechos experimentais.....	31
<b>Quadro 02</b> - Referências encontradas e os respectivos métodos alternativos utilizados e objetivos.....	37

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
2.1 HISTÓRICO MUNDIAL .....	16
2.2 HISTÓRICO NACIONAL.....	17
2.3 POLÊMICAS SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL NA HISTÓRIA.....	20
2.4 MÉTODOS ALTERNATIVOS.....	22
2.5 TESTES ALTERNATIVOS <i>IN VIVO</i> RECONHECIDOS PELO CONCEA.....	24
2.5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO DE PELE .....	24
2.5.1.1 OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea .....	24
2.5.1.2 OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída .....	24
2.5.1.3 OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i> .....	25
2.5.1.4 OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i> .....	25
2.5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR .....	25
2.5.2.1 OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares .....	25
2.5.2.2 OECD TG 460 – Teste de vazamento de fluoresceína .....	25
2.5.2.3 OECD TG 492 – Epitélio corneal humano reconstruído .....	26
2.5.2.4 OECD TG 437 – Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina .....	26
2.5.2.5 OECD TG 438 – Teste de Olho de Galinha .....	26
2.5.2.6 OECD 494 – Vitrigel - Teste de irritação ocular para identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou sério dano ocular .....	26
2.5.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FOTOTOXICIDADE.....	26
2.5.3.1 OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU.....	26
2.5.4 AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO CUTÂNEA .....	26
2.5.4.1 OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i> .....	26
2.5.5 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE .....	27
2.5.5.1 OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i> .....	27
2.5.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA .....	27
2.5.6.1 OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i> .....	27

2.5.7 AVALIAÇÃO DE SENSIBILIZAÇÃO DÉRMICA .....	27
2.5.7.1 OECD TG 442E - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i> : ensaios de sensibilização cutânea <i>in vitro</i> abordando o evento chave na ativação de células dendríticas no Caminho da Resposta Adversa (AOP) para sensibilização cutânea .....	27
2.5.8 AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE .....	27
2.5.8.1 OECD TG 473 - Teste <i>in vitro</i> de aberração cromossômica de mamíferos .....	27
2.5.8.2 OECD TG 476 - Teste <i>in vitro</i> de mutação gênica de células de mamífero usando os gens Hprt and xprt.....	28
2.5.8.3 OECD TG 490 - Testes <i>in vitro</i> de mutação gênica em células de mamífero usando gen Timidinaquinase.....	28
2.5.8.4 OECD TG 471 – Teste de mutação bacteriana reversa .....	28
2.5.9 AVALIAÇÃO DE IRRITAÇÃO E CORROSÃO OCULAR.....	28
2.5.9.1 OECD TG 496 - Teste macromolecular <i>in vitro</i> para identificação de substâncias químicas que induzem dano ocular severo e substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo ....	28
2.5.10 EFEITOS EM SISTEMAS BIÓTICOS .....	28
2.5.10.1 Método OECD TG 319-A - Determinação do <i>clearance</i> intrínseco <i>in vitro</i> .....	28
2.5.10.2 Método OECD TG 319-B - Determinação do <i>clearance</i> intrínseco <i>in vitro</i> .....	29
2.5.11 AVALIAÇÃO DE EFEITOS ESTROGÊNICOS.....	29
2.5.11.1 OECD TG 493 - Teste baseado na performance para ensaios <i>in vitro</i> de receptor estrogênico humano recombinante (hrER) para detectar substâncias químicas com afinidade de ligação ER – Avaliação de efeitos estrogênicos .....	29
2.5.11.2 OECD TG 455 - Teste baseado na performance para ensaios <i>in vitro</i> de transativação transfectada estável para detectar agonistas e antagonistas de receptor estrogênico.....	29
2.5.12 AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA .....	29
2.5.12.1 OECD TG 129 – Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.....	29
2.5.13 EFEITOS ENDÓCRINOS .....	29
2.5.13.1 OECD TG 456 – Ensaio de Esteroidogênese H295R .....	29
2.5.14 EFEITOS ANDROGÊNICOS.....	30
2.5.14.1 OECD 458 – Ensaio de ativação transcripcional de receptores androgênicos humanos transfectados para detecção de atividade agonista e antagonista de substâncias químicas .....	30
2.5.15 TESTE DE ATIVAÇÃO DE MONÓCITOS .....	30

<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>34</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>36</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Medicamentos, cosméticos e produtos de higiene pessoal desempenham um papel fundamental na vida humana globalmente. Essas formulações contêm diversos excipientes, princípios ativos e insumos químicos que precisam ser compreendidos tanto individualmente quanto em conjunto na composição final, é onde entra os diversos testes de segurança toxicológica, de efetividade, fototoxicidade, entre outros, que são requeridos por organizações regulamentares. Comumente na história, tais testes eram feitos utilizando de animais não humanos para os experimentos (Geaquinto *et al.*, 2022).

Durante grande parte da história esses estudos científicos com modelos animais não foram significativamente questionados em razão de seu alto reflexo social, como o desenvolvimento de vacinas contra doenças, como raiva, tétano e difteria. A prática comum de sacrificar animais para obter órgãos e tecidos, ou mesmo induzir a morte para determinar a dose letal de substâncias, gera debates acalorados (Disner, 2019; Monteiro, Silva, 2021).

A utilização de animais em experimentos científicos é um tema complexo que envolve interesses contraditórios. De um lado, a necessidade de desenvolver novos medicamentos e tratamentos para doenças graves impulsiona a pesquisa em modelos animais. Por outro lado, a crescente demanda por produtos estéticos e cosméticos tem expandido o uso de animais em testes, muitas vezes para fins considerados supérfluos pela sociedade. Essa dicotomia gera um debate sobre até que ponto os benefícios para a saúde humana justificam o sofrimento e a morte de animais, e levanta questionamentos sobre a ética da experimentação animal em áreas como a indústria da beleza (Monteiro, Silva, 2021).

O princípio dos 3Rs, estabelecido há mais de 50 anos, representa um marco para a pesquisa animal, sendo incorporado à legislação mundial (Russel, Burch, 1959). Essa abordagem visa reduzir, substituir e refinar o uso de animais em experimentos, promovendo a ciência de alta qualidade e o desenvolvimento de modelos mais próximos da biologia humana. A pressão da sociedade e os princípios da bioética, juntamente a necessidade de prever com maior precisão a segurança e a eficácia de novos produtos, evitando o uso de animais e garantindo resultados mais relevantes para a saúde humana, têm levado ao desenvolvimento de cada vez mais métodos alternativos, que incluem técnicas *in vitro*, modelos computacionais e

simulações, e visam substituir completamente ou diminuir o número de animais utilizados nos testes, além de refinar os procedimentos para minimizar o sofrimento e o estresse dos animais (Disner, 2019; Eberlin *et al.*, 2019).

Defensores dos direitos animais argumentam que a dor e o sofrimento infligidos aos animais são inaceitáveis e que o uso de animais em experimentos deve ser banido. No entanto, a comunidade científica defende a importância desses estudos para o avanço da medicina e outras áreas. Diante desse dilema, a bioética tem desempenhado um papel crucial, buscando conciliar os benefícios da pesquisa com o bem-estar animal (Disner, 2019; Monteiro, Silva, 2021).

Os métodos alternativos oferecem várias vantagens, como maior rapidez, menor necessidade de mão de obra e melhor custo-benefício. Além disso, há a possibilidade de utilizar métodos *in vitro* que utilizam células ou tecidos cultivados fora do organismo em condições laboratoriais controladas, ou até *in silico* utilizando de simulações e modelos computacionais, que não requerem material biológico (Disner, 2019; Santos *et al.*, 2021). Assim, o conhecimento atual dos métodos alternativos que possam substituir ou reduzir o uso de animais em pesquisas e garantir a disponibilidade de ingredientes e produtos cada vez mais seguros é essencial para o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

Diante do exposto, este trabalho se deteve a compilar informações quanto a utilização de métodos alternativos empregados no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos e agrotóxicos em trabalhos publicados em periódicos indexados no período de 2019 a 2024.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 HISTÓRICO MUNDIAL SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Discussões envolvendo animais e saúde humana vêm acontecendo desde antes de 300 a.E.C.. Hipócrates, por fins didáticos, em 450 a.E.C., já relacionava os órgãos humanos e os de animais, e o *Corpus Hippocraticum*, de 350 a.E.C., possui relatos do uso de animais em experimentos, com o passar dos anos a experimentação nesses seres vivos se tornou mais comum e vêm sendo utilizada como forma de se compreender a anatomia, fisiologia e reações que possam aprimorar o conhecimento sobre doenças e seus mecanismos, bem como para controle e qualidade de novas drogas, cosméticos e agrotóxicos criados (Presgrave, 2008; Santos *et al.*, 2021).

Por outro lado, a preocupação sobre bem estar animal e os aspectos éticos envolvendo tais experimentos se tornou crescente e é refletida desde o final do século XVIII, com filósofos como Voltaire e Kant criticando a crueldade animal e refutando a ideia que os animais são incapazes de sofrer, e posterior criação da Lei Inglesa *British Anticruelty Act* combatendo a crueldade no uso de animais em 1822 e logo em seguida (1824) a criação da primeira Sociedade de Prevenção à Crueldade Animal (*Society for the Prevention of Cruelty to Animals – SPCA*) na Grã-Bretanha. O Reino Unido foi pioneiro na legislação de proteção animal, aprovando a primeira lei contra a crueldade em 1876. No entanto, a conscientização sobre o bem-estar animal se difundiu mais amplamente no século XX. A Índia, a França e os Estados Unidos aderiram a essa tendência, promulgando leis semelhantes nos anos de 1960, 1963 e 1966, respectivamente (Disner, 2019; Andrade *et al.*, 2023; Prado, Bizawu, 2023).

Em 1959, Russell e Burch, no livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, abordaram o conceito dos 3Rs na experimentação animal, que significam Reduzir, Refinar e Substituir (*Reduction, Refinement e Replacement*) os experimentos usando cobaias sempre que possível (Pedro, Bento, 2023). Além do mais, diversas legislações foram implementadas para regular o uso de animais em pesquisas, estabelecendo critérios rigorosos para a aprovação de protocolos experimentais e exigindo que os animais sejam tratados com o máximo cuidado, bem como exigir a implantação e validação de modelos alternativos aos experimentos tradicionalmente executados. Diante disso, foram criados conselhos e comitês de ética para monitorar o cumprimento dessas normas e garantir o bem-estar dos animais utilizados em pesquisas (Disner, 2019; Monteiro, Silva, 2021).

A investigação de alternativas à experimentação animal iniciou-se em 1969, com a criação do *Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments* - FRAME no Reino Unido, iniciativa pautada em pro do Princípio dos 3Rs. A descoberta de diferenças metabólicas entre humanos e animais impulsionou a necessidade de modelos mais precisos e a validação de novas metodologias (Pedro, 2021).

A partir da década de 1980, a política de estímulo a essas alternativas se intensificou, com a criação de centros de documentação e validação em diversos países, como o *Zentralstelle zur Erfassung/Bewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch* - ZEBET (Alemanha), sendo o primeiro do tipo, criado em 1989, seguido em 1991 pela criação do *European Centre for the Validation of Alternative Methods* - ECVAM (Europa), em 1997 do *Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods* - ICCVAM (EUA), em 2005 do *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods* - JaCVAM (Japão) e, mais recentemente, no ano de 2013, após diversas tentativas de implantação, antes até da Lei Arouca, o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos - BraCVAM (Brasil), o que mostra que no Brasil, a busca de mudança da experimentação animal para métodos alternativos, até mesmo do saber sobre esses métodos, vêm sendo um processo lento (Presgrave, 2008; Presgrave *et al.*, 2016; Pedro, 2021).

Uma peça chave no avanço internacional sobre os métodos alternativos foi a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, do inglês *Economic Co-operation and Development* (OECD), criada em 1959, a qual desempenha um papel central na validação de métodos alternativos. Suas principais funções incluem coordenar e harmonizar políticas, discutir questões de interesse comum e colaborar na solução de problemas internacionais. A OECD estabelece diretrizes de ensaios amplamente aceitas, que são utilizadas por instituições independentes, órgãos governamentais e setores industriais. O desenvolvimento de métodos validados pela OECD e as publicações dos guias de testes (*testing guide* - TG) possibilitou a substituição do uso de animais em pesquisas de produtos cosméticos em muitos países (Eberlin *et al.*, 2019; Pedro, 2021).

## 2.1 HISTÓRICO NACIONAL SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A primeira legislação nacional que visava proteger os direitos dos animais é de 1886 e teve como objetivo coibir os maus-tratos e castigos físicos a animais usados

em veículos de tração. Com posterior abordagem sobre experimentação científica com animais em 1934, no Decreto-Lei nº 24.645, e em 1941, com o Decreto nº 3.688, houve o estabelecimento de prisão como pena para atos de crueldade animais, inclusive aqueles ocorridos nas práticas com fins científicos (Prado, Bizawu, 2023). Em 1979, a Lei nº 6.638, estabeleceu normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais de maneira a minimizar o sofrimento, autorizando a realização da prática em todo território nacional.

Em 1988, a Constituição Federal reconheceu a importância da proteção animal, impondo ao Estado o dever de preservar a fauna (artigo 225, inciso VII). Essa proteção foi reforçada em 1998 com a Lei de Crimes Ambientais (Lei nº 9.605/1998), que tipificou o crime de maus-tratos contra animais, incluindo aqueles praticados em atividades como ensino e pesquisa, quando existirem recursos alternativos (Brasil, 1998). O Decreto Brasileiro número 4.725, de 9 de junho de 2003, determina que uma das atividades do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é estabelecer as regras e procedimentos de controle de qualidade para a rede de laboratórios de saúde, tarefa, porém, complexa devido à diversidade de produtos e à ausência de validação internacional para muitos métodos, demonstrando a importância que se tinha de criar um centro de validação nacional (Presgrave *et al.*, 2016; Prado, Bizawu, 2023).

Apenas em 2008, com a Lei Arouca (Lei nº 11.794/2008) houve a regulamentação do uso de animais em ensino e pesquisa, estabelecendo critérios rigorosos para garantir o bem-estar animal nessas atividades, com essa lei, houve também a criação, em cada instituição de pesquisa, da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e, a nível nacional, do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) (Decreto nº 6.899/2009). Entretanto, a lei não estabeleceu que sempre que existissem métodos alternativos, os animais não poderiam mais ser utilizados, e não se tinha um centro para auxiliar a coordenação dos estudos sobre esses métodos e sua validação (Brasil, 2008; Presgrave *et al.*, 2010).

O Brasil, em linha com a tendência mundial, aderiu aos padrões da OECD para validação de métodos alternativos e seus guias de testes como base para os métodos. Como resultado, em julho de 2012, o Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), renovada em 2024 com prazo de três anos, a qual é responsável por promover a implementação, o desenvolvimento e a validação de métodos alternativos ao uso de

animais, além da adoção de métodos alternativos ao uso de animais nas atividades de ensino e pesquisa. Em setembro do mesmo ano, mas lançado oficialmente em 2013, foi instituído o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), fruto de uma parceria entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Passos esses importantes e essenciais no avanço da pesquisa científica nacional (Presgrave *et al.*, 2016).

Diante disso, diferentes estados, começaram a aprovar leis que proíbem a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes, tendo como principiante o estado de São Paulo (Lei nº 15.316/2014), seguido de: Mato Grosso do Sul – Lei nº 4.538/2014; Paraná – Lei nº 18.668/2015 (atualizada pela Lei nº 21.657/2023); Amazonas – Lei nº 289/2015; Pará – Lei nº 8.351/2016; Rio de Janeiro – Lei nº 7.814/2017; Minas Gerais – Lei nº 23.050/2018; Pernambuco – Lei nº 16.498/2018; Santa Catarina – Lei nº 18.009/2020; Distrito Federal – Lei nº 6.721/2020; Espírito Santo – Lei nº 11.325/2021; Acre – Lei nº 3.797/2021; Paraíba – Lei nº 12.310/2022; Mato Grosso – Lei nº 12.316/2023; Rio Grande do Norte – Lei nº 11.617/2023.

Respectivamente nos anos de 2014, 2016, 2019 e 2022, 41 métodos alternativos validados foram reconhecidos no Brasil pelo CONCEA a partir da promulgação das Resoluções Normativas (RN) nº 18, 31, 45 e 56 (Quadro 01) com prazo limite estabelecido de 5 anos para a substituição obrigatória dos métodos originais pelos alternativos (Concea, 2014, 2016, 2019, 2022a).

Em 2022, substituindo a RN 17/2014, que dispôs sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, a RN CONCEA nº 54 estabelece que métodos alternativos, devidamente validados e com reconhecimento internacional, tornam-se oficialmente adotados no Brasil após sua publicação no Diário Oficial da União, com prazo de 5 anos para adequação (Concea, 2022b).

Em 2023, a Resolução nº 58, traz um marco histórico para a busca da extinção do uso de animais em pesquisas científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências. E traz no Art. 2º a obrigação do uso de métodos alternativos

para testes de cosméticos que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos cuja segurança ou eficácia não tenham sido comprovadas cientificamente, ressalvadas as competências de outros entes e órgãos públicos com função regulatória (Brasil, 2023).

A legislação brasileira que trata dos direitos animais, iniciada no século XIX, passou por um longo período de lentos avanços. No entanto, com a crescente conscientização sobre o tema e a pressão da sociedade civil, tem experimentado mudanças significativas nas últimas décadas. A pauta dos direitos animais, cada vez mais presente no debate público, impulsiona a busca por normas mais justas e eficazes para proteger os animais.

## 2.2 POLÊMICAS SOBRE A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL AO LONGO DA HISTÓRIA

*“Imagine uma seringa sendo forçada garganta abaixo para injetar um produto químico em seu estômago, ou ser contido e forçado a respirar vapores nauseantes por horas. Essa é a cruel realidade dos testes em animais para milhões de ratos, coelhos, cães e outros animais no mundo todo.”* (HSI, 2024)

A experimentação animal, uma prática controversa que envolve a utilização de animais vivos em pesquisas científicas, tem sido objeto de debates éticos há décadas. Apesar das contribuições para o avanço da medicina e da ciência, essa prática suscita questionamentos sobre o sofrimento animal e a existência de métodos alternativos. Animais são submetidos a uma variedade de procedimentos, como a indução de doenças e a administração de substâncias, com o objetivo de compreender doenças, desenvolver novos tratamentos e avaliar a segurança de produtos. Neste tópico, serão abordados alguns experimentos polêmicos envolvendo testes com animais.

O teste de Draize, um método controverso criado na década de 1940, é um teste realizado em coelhos, que determina a irritação ocular induzida por medicamentos, cosméticos e outras substâncias químicas. O teste de irritação ocular ficou muito conhecido em 2021 através da animação ‘*Save Ralph*’, nesse teste a substância é aplicada diretamente nos olhos do animal, que é mantido sob contenção para evitar que feche as pálpebras. Sem anestesia, os animais podem permanecer até 3 semanas com os olhos abertos, sofrem intensa dor e podem desenvolver inflamações, hemorragias, úlceras e cegueira, tanto temporária quanto permanente (Figura 01). Após semanas de sofrimento, muitos são eutanasiados para análise

(Andrade *et al.*, 2023).

Figura 01: 'Save Ralph' e coelho vítima de testagem de irritação ocular



Fonte: Liberdade roubada. **Testes em animais.** Disponível em: <https://liberdaderoubada.wordpress.com/2013/09/28/teste-em-animais/>. Acesso em: 10/09/2024

Há também os testes de irritação dermal, no qual os animais são submetidos a um processo doloroso de depilação e, em seguida, têm produtos químicos aplicados diretamente em sua pele exposta. Durante horas, os animais são imobilizados e observados enquanto sofrem os efeitos da substância, que podem incluir vermelhidão, inchaço, sangramento e até mesmo a morte das células da pele (Figura 02). Ao final, os animais são eutanasiados para análise mais detalhada (Andrade *et al.*, 2023).

Figura 02: Coelho após teste de irritação dermal



Fonte: Adaptado de Andrade *et al.*, 2023

Os testes de dose letal mediana (DL50) são particularmente cruéis. Nesses testes, animais são forçados a ingerir doses letais de substâncias até que metade do grupo morra. O sofrimento é intenso, com sintomas como convulsões, diarreia,

dificuldade para respirar, sangramento e lesões em diversos órgãos. A morte, muitas vezes, é lenta e dolorosa (Andrade *et al.*, 2023). Outros testes similares são os testes de Toxicidade Alcoólica e Tabaco, nos quais os animais são obrigados a inalar fumaça e se embriagar, para que depois serem dissecados, a fim de estudar os efeitos de suas substâncias no organismo (Figura 03).

Figura 03: Cães inalando substâncias para testes



Fonte: Adaptado de Andrade *et al.*, 2023

A ética e a ciência caminham lado a lado quando o assunto é a utilização de animais em pesquisas. A crescente compreensão da senciência animal, aliada às evidências científicas que demonstram a limitada capacidade dos testes animais em prever resultados em humanos, exige uma mudança de paradigma. Métodos alternativos, como os baseados em células humanas e modelos computacionais, oferecem uma alternativa mais precisa e ética para o desenvolvimento de novos produtos e medicamentos (Aguiar *et al.*, 2019).

Quando questionado sobre os impactos da proibição de testes em animais para cosméticos, o CONCEA, órgão regulador brasileiro, destacou que a experiência europeia demonstra que essa medida não prejudica o avanço científico. Ao contrário, a substituição de animais por métodos alternativos, como testes *in vitro* e modelos computacionais, tem se mostrado mais precisa, rápida e econômica. Essa mudança atende a crescentes demandas éticas da sociedade e contribui para o desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes. Isto posto, torna-se imprescindível discutir alternativas à utilização de animais (Aguiar *et al.*, 2019).

### 2.3 MÉTODOS ALTERNATIVOS

Métodos alternativos ao uso de animais são definidos como qualquer estratégia que permita substituir, reduzir ou refinar o emprego de animais em atividades científicas e pedagógicas. Esses métodos, validados e reconhecidos internacionalmente, garantem a obtenção de resultados equivalentes aos obtidos em modelos animais, com maior reprodutibilidade e menor sofrimento para os animais. As metodologias alternativas podem envolver a utilização de culturas de células, modelos computacionais, redução do número de animais por experimento ou o refinamento de procedimentos para minimizar o desconforto animal (Brasil, 2009).

A comunidade científica brasileira vem explorando métodos alternativos para a utilização de animais em experimentos desde 1989. O marco inicial foi a publicação de um artigo propondo a diminuição do número de animais utilizados no ensaio de DL50 (Presgrave *et al.*, 2016). No Brasil, as metodologias são classificadas pelo CONCEA como métodos alternativos validados e métodos alternativos reconhecidos.

Os métodos alternativos validados são aqueles cuja confiabilidade e relevância para um determinado objetivo foram estabelecidas por meio de várias etapas, incluindo o desenvolvimento da metodologia, pré-validação, validação formal e revisão por um comitê de especialistas. Esses métodos demonstram conformidade com ensaios realizados em centros de validação ou com estudos internacionais, podendo obter aceitação regulatória em nível global, muitos deles baseados nas diretrizes da OECD. Por outro lado, os métodos alternativos validados reconhecidos são os ensaios que foram validados e posteriormente reconhecidos pelo CONCEA e aceitos pela ANVISA no Brasil, tendo observância obrigatória no país com prazo de 5 anos (Anvisa, 2012; Conceca, 2022a).

O Brasil conta com três entidades (BraCVAM, ReNaMA e CONCEA) para realizar todo o processo, desde a validação, reconhecimento, aceitação regulatória e implementação de métodos alternativos ao uso animal. Cada um deles desempenha um papel específico no processo, mas também colaboram entre si durante todo o processo (Presgrave *et al.*, 2016).

Um método alternativo pode consistir em um experimento *in vivo* que utilize um modelo animal diferente do originalmente proposto, como por exemplo, a substituição de primatas por vertebrados considerados filogeneticamente inferiores. Outra possibilidade é o emprego de estágios larvais em substituição a animais adultos ou a utilização de microrganismos como modelos experimentais. Essas abordagens visam reduzir o número de animais utilizados e minimizar o sofrimento animal durante os

procedimentos experimentais (Disner, 2019).

Além desses, observa-se uma crescente tendência à substituição de modelos animais por testes *in vitro*. Nesses testes, células ou tecidos são isolados de organismos vivos e cultivados em condições controladas em laboratório, permitindo a realização de experimentos sem a utilização de animais. Os testes *in vitro* são uma abordagem eficiente para avaliar substâncias químicas ou produtos nas fases iniciais de desenvolvimento, permitindo o estudo da resposta celular em um sistema fechado com condições experimentais bem controladas (Disner, 2019; Santos *et al.*, 2021).

No Brasil, 41 métodos alternativos validados foram reconhecidos pelo CONCEA, entre os quais 28 são testes *in vitro* divididos entre os seguintes desfechos experimentais: Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular; Avaliação do potencial de sensibilização cutânea; Avaliação de sensibilização dérmica; Avaliação de efeitos estrogênicos; Avaliação de mutagenicidade; Avaliação de irritação e corrosão ocular; Efeitos em sistemas bióticos; Avaliação do potencial de irritação e corrosão de pele; Avaliação do potencial de fototoxicidade; Avaliação da absorção cutânea; Avaliação de genotoxicidade. Cada teste *in vitro* será descrito no próximo tópico de maneira sucinta, categorizados segundo sua finalidade conforme as diretrizes da OECD, visto que serão o foco do presente trabalho, e os demais estarão listados no Quadro 01.

## 2.5 TESTES ALTERNATIVOS *IN VITRO* RECONHECIDOS PELO CONCEA

Todos os protocolos são de fácil acesso por meio das publicações disponíveis na biblioteca da OECD on-line e por meio do compêndio 'Métodos Alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil' desenvolvido pela Academia de Ciências Farmacêuticas do Brasil (ACFB) e a Academia Nacional de Farmácia (ANF), juntamente com a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) em 2019.

### 2.5.1 Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele

Permite a identificação de substâncias e misturas não-corrosivas e corrosivas de acordo com o Sistema Global de Harmonização de Classificação e Rotulagem das Nações Unidas (ONU) de substâncias químicas (GHS).

#### 2.5.1.1 OECD TG 430 - Corrosão dérmica *in vitro*: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea

Baseia-se no método de teste de resistência elétrica transcutânea da pele do rato, que utiliza discos de pele para identificar produtos corrosivos pela sua

capacidade de produzir uma perda de integridade da camada córnea normal e função de barreira.

#### 2.5.1.2 OECD TG 431 - Corrosão dérmica *in vitro*: Teste da Epiderme Humana Reconstituída

Utiliza a epiderme humana reconstruída (RhE) (obtida a partir de queratinócitos epidérmicos não transformados derivados de humanos) que imita de perto as propriedades histológicas, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas das partes superiores da pele humana, isto é, a epiderme. Baseia-se na premissa de que os corrosivos são capazes de penetrar o estrato córneo por difusão ou erosão, sendo citotóxicos às células das camadas inferiores. Esse teste demonstrou ser preditivo ao teste *in vivo* de corrosão dérmica usando coelhos.

#### 2.5.1.3 OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana *in vitro*

O método de teste utiliza uma membrana artificial projetada para responder a substâncias químicas corrosivas de maneira similar à da pele do animal (originalmente, coelhos) *in situ*. Detecta danos à barreira de membranas após a aplicação do composto na superfície da membrana artificial.

#### 2.5.1.4 OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea *in vitro*

Baseia-se no sistema de teste *in vitro* da epiderme humana reconstituída (RhE), que imita de perto as propriedades bioquímicas e fisiológicas das camadas superiores da pele humana, isto é, a epiderme, permitindo a identificação de compostos químicos irritantes manifestados principalmente por eritema ou edema. Estes são o resultado de uma cascata de eventos iniciados pela penetração do composto pelo estrato córneo, danificando as camadas de queratinócitos e outras células da pele. O sistema de teste RhE utiliza queratinócitos não transformados, derivados de humanos, como fonte celular para reconstruir um modelo epidérmico com histologia e citoarquitetura representativas.

### 2.5.2 Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular

#### 2.5.2.1 OECD TG 491 - Teste *in vitro* de curta duração para danos oculares

Baseia-se na citotoxicidade, usando o ensaio viabilidade celular MTT, em uma monocamada confluyente de células de córnea de coelho cultivadas em laboratório

#### 2.5.2.2 OECD TG 460 – Teste de vazamento de fluoresceína

Avalia o potencial de corrosividade ocular e irritação severa por meio de danos a uma monocamada epitelial confluyente impermeável. Os efeitos são medidos por um aumento da permeabilidade da fluoresceína de sódio mediante a monocamada

epitelial de células de rim canino Madin-Darby cultivadas em insertos permeáveis.

Embora o método de teste fluoresceína não seja considerado válido como um substituto completo para o teste do olho de coelho *in vivo*, é recomendado para uso como parte de uma estratégia de teste escalonada para classificação e rotulagem regulamentar.

#### 2.5.2.3 OECD TG 492 – Epitélio corneal humano reconstruído

Avaliação de risco ocular sobre modelos tridimensionais-3D comerciais que são produzidos utilizando queratinócitos humanos primários, como EpiOcular® e SkinEthic®, medido pelo ensaio de viabilidade celular MTT.

#### 2.5.2.4 OECD TG 437 – Teste de Opacidade e Permeabilidade da Córnea Bovina

Avalia o risco potencial ao olho pela indução da opacidade (medidos por diminuição da transmissão da luz) e aumento da permeabilidade (medido pelo aumento da passagem de corante de fluoresceína de sódio) de córnea bovina isolada, proveniente de gado recém-abatido para consumo.

#### 2.5.2.5 OECD TG 438 – Teste de Olho de Galinha

Avalia o risco de uma substância química pela habilidade de induzir toxicidade em um olho de frango enucleado (removido da órbita e proveniente de abatedouros, eliminando a necessidade de animais de laboratório). São medidas a opacidade, o dano ao epitélio, o aumento da espessura e os danos morfológicos macroscópicos.

2.5.2.6 OECD 494 – Vitrigel - Teste de irritação ocular para identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou sério dano ocular.

Este teste mede o potencial de irritação ocular de um produto químico de teste com base em sua capacidade de induzir danos à função de barreira do epitélio da córnea humana (hCE) em modelos usados no método Vitrigel-EIT.

#### 2.5.3 Avaliação do potencial de Fototoxicidade

##### 2.5.3.1 OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade *in vitro* 3T3 NRU

Identifica o potencial fototóxico de uma substância induzida por excitação química após exposição à luz pela redução relativa da viabilidade das células expostas ao composto na presença versus ausência de luz. Utiliza uma linhagem celular de fibroblasto murinho.

#### 2.5.4 Avaliação da absorção cutânea

##### 2.5.4.1 OECD TG 428 - Absorção Cutânea método *in vitro*

A substância teste é aplicada na superfície da amostra de pele que separa duas câmaras de difusão, uma câmara doadora e uma receptora entre as quais é posicionada a pele. É mensurada a propagação de substâncias químicas para o interior e através da pele até um reservatório de fluido e podem utilizar pele não viável, para medir a difusão de produtos químicos apenas, ou usar pele fresca, metabolicamente ativa, para simultaneamente medir difusão e metabolismo cutâneo.

#### 2.5.5 Avaliação de genotoxicidade

##### 2.5.5.1 OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero *in vitro*

O método detecta micronúcleos no citoplasma formados por quebras ou perdas cromossômicas após a exposição. Linfócitos de sangue periférico primários humanos cultivados ou de outros mamíferos e um grande número de linhagens celulares de roedores podem ser usadas.

#### 2.5.6 Avaliação do potencial de sensibilização cutânea

##### 2.5.6.1 OECD TG 442D - Sensibilização cutânea *in vitro*

Utiliza uma linhagem celular aderente imortalizada derivada de queratinócitos humanos-HaCaT estavelmente transfectados com um plasmídeo selecionável. A linhagem celular contém o gene da luciferase sob o controle transcricional de um promotor constitutivo de um gene que é conhecido por ser suprarregulado por sensibilizadores de contato.

#### 2.5.7 Avaliação de sensibilização dérmica

2.5.7.1 OECD TG 442E - Sensibilização cutânea *in vitro*: ensaios de sensibilização cutânea *in vitro* abordando o evento chave na ativação de células dendríticas no Caminho da Resposta Adversa (AOP) para sensibilização cutânea

Utiliza o método h-CLAT, que quantifica mudanças na expressão de marcadores de superfície celular associados ao processo de ativação de monócitos e células dendríticas (DC) (ou seja, CD86 e CD54), na linhagem de células de leucemia monocítica humana THP-1, após exposição a sensibilizadores. Os níveis de expressão medidos dos marcadores de superfície celular CD86 e CD54 são então usados para dar suporte à discriminação entre sensibilizadores e não sensibilizadores da pele.

#### 2.5.8 Avaliação de mutagenicidade

2.5.8.1 OECD TG 473 - Teste *in vitro* de aberração cromossômica de mamíferos

O teste de aberração cromossômica *in vitro* identifica produtos químicos que

induzem aberrações cromossômicas estruturais (quebras, exclusões e rearranjos) em culturas de linhagens celulares estabelecidas ou culturas de células primárias, incluindo linfócitos de sangue periférico humano ou de outros mamíferos.

2.5.8.2 OECD TG 476 - Teste *in vitro* de mutação gênica de células de mamíferos usando os gens Hprt and xpRT.

Para o ensaio XPRT, o transgene bacteriano gpt que codifica a enzima XPRT, um análogo bacteriano da enzima de proteína HPRT de mamíferos, é usado. A localização autossômica do locus gpt permite a detecção de certos eventos genéticos.

2.5.8.3 OECD TG 490 - Testes *in vitro* de mutação gênica em células de mamíferos usando gen Timidinaquinase.

Os ensaios usam duas linhas celulares heterozigotas da timidina quinase (TK) específicas, de maneira a identificar produtos químicos que causam mutações genéticas no gene repórter TK.

2.5.8.4 OECD TG 471 – Teste de mutação bacteriana reversa

Este teste usa cepas específicas de duas espécies de bactérias, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Cada cepa contém mutações identificadas em um gene de biossíntese de aminoácidos como o gene repórter. Essas mutações impedem o crescimento bacteriano na ausência do aminoácido no meio de crescimento. A exposição a mutagênicos pode induzir uma mutação (uma reversão) que restaurará a sequência de DNA do tipo selvagem, ou o fenótipo do tipo selvagem, e a capacidade funcional da bactéria de sintetizar o aminoácido essencial e, portanto, crescer no meio sem o aminoácido necessário.

2.5.9 Avaliação de irritação e corrosão ocular

2.5.9.1 OECD TG 496 - Teste macromolecular *in vitro* para identificação de substâncias químicas que induzem dano ocular severo e substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo

Baseia-se no uso de uma matriz macromolecular e um disco de membrana para entrega do produto teste. Os produtos químicos de teste que podem causar sérios danos oculares/irritação ocular devem ser capazes de promover desnaturação de proteínas, ou seja, desdobramento de proteínas e mudanças na conformação que resultam na ruptura e desagregação da matriz macromolecular altamente organizada. Essas mudanças produzem turbidez que pode ser medida pelo aumento resultante na densidade óptica.

2.5.10 Efeitos em sistemas bióticos

#### 2.5.10.1 Método OECD TG 319-A - Determinação do *clearance* intrínseco *in vitro*

Baseia-se no uso de hepatócitos criopreservados de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (RT-HEP) para determinar o CL, IN VITRO, INT de um produto químico de teste usando uma abordagem de depleção de substrato.

#### 2.5.10.2 Método OECD TG 319-B - Determinação do *clearance* intrínseco *in vitro*

Baseia-se no uso da fração subcelular S9 do fígado (RTS9) da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) para determinar a depuração intrínseca *in vitro* (CL, IN VITRO, INT) de um produto químico de teste usando uma abordagem de depleção de substrato.

### 2.5.11 Avaliação de efeitos estrogênicos

2.5.11.1 OECD TG 493 - Teste baseado na performance para ensaios *in vitro* de receptor estrogênico humano recombinante (hrER) para detectar substâncias químicas com afinidade de ligação ER – Avaliação de efeitos estrogênicos

Este ensaio mede a capacidade de um ligante radiomarcado ([<sup>3</sup>H]17β-estradiol) de se ligar ao ER na presença de concentrações crescentes de um produto químico de teste (ou seja, concorrente)

2.5.11.2 OECD TG 455 - Teste baseado na performance para ensaios *in vitro* de transativação transfectada estável para detectar agonistas e antagonistas de receptor estrogênico.

As linhagens celulares usadas nesses ensaios expressam receptores estrogênicos (ER) e foram transfectadas de forma estável com um gene repórter de luciferase responsivo a ER. Os ensaios são usados para identificar produtos químicos que ativam (ou seja, agem como agonistas) e também suprimem (ou seja, agem como antagonistas) a transcrição dependente de ER.

### 2.5.12 Avaliação de toxicidade aguda

2.5.12.1 OECD TG 129 – Estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica

Trata do uso de testes de citotoxicidade para estimar as doses iniciais que serão utilizadas em testes de toxicidade aguda oral sistêmica, minimizando o número de animais.

### 2.5.13 Efeitos endócrinos

2.5.13.1 OECD TG 456 – Ensaio de Esteroidogênese H295R

Baseia-se no uso de linhagem de células de adenocarcinoma humano H295R, que expressa genes que codificam todas as enzimas-chave para a esteroidogênese. Após um período de aclimação de 24h em placas multipoços, as células são expostas por 48 h a sete concentrações do produto químico de teste em pelo menos triplicado e as concentrações são medidas.

#### 2.5.14 Efeitos androgênicos

2.5.14.1 OECD TG 458 – Ensaio de ativação transcripcional de receptores androgênicos humanos transfectados para detecção de atividade agonista e antagonista de substâncias químicas

Baseia-se no uso de linhagens celulares que expressam receptores androgênicos (AR) e foram transfectadas de forma estável com um gene repórter de luciferase responsivo a AR, e são usadas para identificar substâncias químicas que ativam (ou seja, agem como agonistas) ou inibem (ou seja, agem como antagonistas) a transcrição dependente de AR. De maneira que se houver ativação do receptor, resultará em um aumento da expressão celular da enzima luciferase. A enzima então transforma o substrato em um produto bioluminescente que pode ser medido quantitativamente com um luminômetro.

#### 2.5.15 Teste de Ativação de Monócitos

O teste utiliza sangue humano como reagente. Os monócitos, um tipo de glóbulo branco, são isolados do sangue. Os monócitos isolados são incubados com a amostra do produto que se deseja analisar. Se a amostra contiver pirogênios, os monócitos serão ativados e produzirão substâncias inflamatórias, como a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ). A quantidade de IL-1 $\beta$  produzida é medida utilizando técnicas de imunoenensaio. Essa quantidade é diretamente proporcional à quantidade de pirogênios presentes na amostra.

Quadro 01: Métodos alternativos validados reconhecidos no Brasil, Resoluções Normativas e desfechos experimentais

<b>Resolução Normativa - Conceia</b>	<b>Método alternativo</b>	<b>Desfecho experimental</b>
<b>RN nº18, de 24 de setembro de 2014</b>	Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina	Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular
	Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha	
	Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína	
	Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste de Resistência Elétrica Transcutânea	Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele
	Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica <i>in vitro</i> : Teste da Epiderme Humana Reconstituída	
	Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana <i>in vitro</i>	
	Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea <i>in vitro</i>	Avaliação do potencial de Fototoxicidade
	Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade <i>in vitro</i> 3T3 NRU	
	Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método <i>in vitro</i>	
	Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local	Avaliação do potencial de sensibilização cutânea
	Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local	Avaliação de toxicidade aguda
	Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas	
	Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda	
	Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento " <i>Up and Down</i> "	
Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica		
Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero <i>in vitro</i>	Avaliação de genotoxicidade	
<b>RN nº 31, de 18 de agosto de 2016</b>	Método OECD TG 491 - Teste <i>in vitro</i> de curta duração para danos oculares	Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular
	Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído	
	Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea <i>in chemico</i>	Avaliação do potencial de sensibilização cutânea
	Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i>	
	Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento	Avaliação de toxicidade reprodutiva
	Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva	
	Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)	Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis
<b>RN nº 45, de 22 de outubro de 2019</b>	Teste de Ativação de Monócitos (MAT)	Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis

<b>RN nº 56, de 5 de outubro de 2022</b>	Método OECD TG 442E - Sensibilização cutânea <i>in vitro</i> : ensaios de sensibilização cutânea <i>in vitro</i> abordando o evento chave na ativação de células dendríticas no Caminho da Resposta Adversa (AOP) para sensibilização cutânea	Avaliação da sensibilização dérmica
	Método OECD TG 455 - Teste baseado na performance para ensaios <i>in vitro</i> de transativação transfectada estável para detectar agonistas e antagonistas de receptor estrogênico	Avaliação de efeitos estrogênicos
	Método OECD TG 493 - Teste baseado na performance para ensaios <i>in vitro</i> de receptor estrogênico humano recombinante (hrER) para detectar substâncias químicas com afinidade de ligação ER	Avaliação de efeitos endócrinos
	Método OECD TG 456 - Ensaio de Esteroidogênese H295R	Avaliação de efeitos androgênicos
	Método OECD TG 458 - Ensaio de ativação transcricional de receptores androgênicos humanos transfectados para detecção de atividade agonista e antagonista de substâncias químicas	Avaliação de efeitos androgênicos
	Método OECD TG 471 - Teste de mutação bacteriana reversa	Avaliação de mutagenicidade
	Método OECD TG 473 - Teste <i>in vitro</i> de aberração cromossômica de mamíferos	
	Método OECD TG 476 - Testes <i>in vitro</i> de mutação gênica de células de mamífero usando os gens Hprt and xprt	
	Método OECD TG 490 - Testes <i>in vitro</i> de mutação gênica em células de mamífero usando gen Timidinaquinase	Avaliação de irritação e corrosão ocular
	Método OECD TG 494 - Vitrigel - Teste de irritação ocular para identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou sério dano ocular	
	Método OECD TG 496 - Teste macromolecular <i>in vitro</i> para identificação de substâncias químicas que induzem dano ocular severo e substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo	Avaliação de fotorreatividade
	OECD TG 495 - Ensaio de fotorreatividade por Ros (Espécies oxigênio reativas)	Efeitos em sistemas bióticos
	Método OECD TG 212 - Peixe, teste de toxicidade a curto prazo em estágios embrionários e recém nascidos	
	Método OECD TG 236 - Toxicidade aguda em embrião de peixe (FET)	
	Método OECD TG 319-A - Determinação do "clearance" intrínseco " <i>in vitro</i> " usando hepatócitos criopreservados de Truta Arco-Íris (RT-HEP)	
Método OECD TG 319-B - Determinação do "clearance" intrínseco " <i>in vitro</i> " usando fração sub-celular S-9 de Truta Arco-Íris (RT-S9)		

Fonte: Concea, 2014, 2016, 2019, 2022

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar um levantamento bibliográfico acerca da utilização de métodos alternativos *in vitro* que estão sendo utilizados para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos, agrotóxicos e cosméticos no período de 2019 a 2024.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar quais métodos *in vitro* estão sendo empregados para substituir os testes em animais na avaliação da segurança e eficácia de produtos;
- Realizar uma revisão integrativa da literatura sobre a utilização dos métodos *in vitro* validados e reconhecidos nacionalmente;
- Avaliar a eficácia dos métodos *in vitro* em estudos realizados no Brasil;
- Identificar as principais lacunas de conhecimento nacional e as áreas que necessitam de mais pesquisas.

#### 4.0 METODOLOGIA

Este estudo consiste em uma revisão integrativa de literatura (RIL), que possibilita a identificação, síntese e análise abrangente de trabalhos sobre um tema específico. Para isso, foram seguidas as etapas a seguir: definição do tema e formulação da questão de pesquisa; elaboração dos critérios de elegibilidade, incluindo e excluindo estudos; levantamento de publicações nas bases de dados; categorização e análise das informações obtidas; avaliação dos estudos selecionados; e apresentação dos resultados, que inclui uma análise crítica dos achados e uma síntese da revisão (Silva *et al.*, 2020).

Para a elaboração da pergunta norteadora deste estudo, utilizou-se a estratégia de T.Q.O. (T – Tema; Q – Qualificador, característica; O – Objeto de pesquisa indivíduo, população, procedimento, dispositivo), sendo respectivamente → T: métodos alternativos ao uso de animais; Q: O qualificador "*in vitro*" delimita o escopo da pesquisa para métodos que utilizam células e tecidos cultivados em laboratório.; O: métodos validados e reconhecidos no Brasil (Dantas *et al.*, 2021).

Assim sendo, a presente RIL tem como pergunta norteadora: “Como os métodos *in vitro* estão sendo utilizados para o desenvolvimento de uma indústria farmacêutica e cosmética mais ética e eficiente, sem comprometer a segurança dos produtos?”. Pergunta pertinente visto que a utilização de animais em experimentos científicos é um tema controverso e cada vez mais questionado pela sociedade. A busca por alternativas é impulsionada por razões éticas, científicas e econômicas. Os métodos *in vitro*, que utilizam células e tecidos cultivados em laboratório, apresentam-se como uma promissora alternativa, com potencial para reduzir o sofrimento animal e gerar resultados mais precisos e relevantes para a saúde humana.

Após definição da pergunta norteadora, para a construção desse estudo as bases de dados utilizadas foram a BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), a qual aborda as bases de dados: LILACS; MEDLINE; MEDCARIB; PAHO-IRIS; WHOLIS, CAFe (Comunidade Acadêmica Federada) da CAPES e Google Acadêmico. A busca dos artigos foi realizada em formulário avançado, no intervalo de anos entre 2019-2024, sendo considerados como descritores os códigos de cada método alternativo *in vitro* listados a seguir: OECD TG 455, OECD TG 129, OECD TG 456, OECD TG 458, OECD TG 471, OECD TG 494, OECD TG 437, OECD TG 492, OECD TG 460, OECD TG 491, OECD TG 442D, OECD TG 442E, OECD TG 493, OECD TG 473, OECD TG

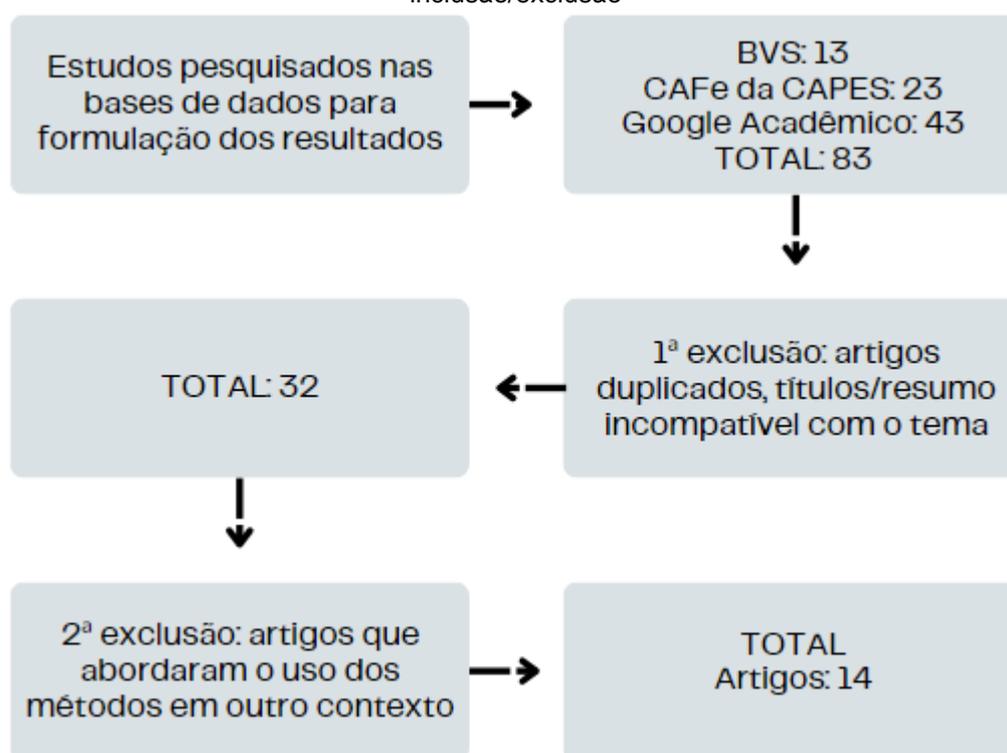
476, OECD TG 490, OECD TG 496, OECD TG 319-A, OECD TG 319-B, OECD TG 430, OECD TG 431, OECD TG 435, OECD TG 439, OECD TG 348, OECD TG 432, OECD TG 428, OECD TG 487 e Teste de Ativação de Monócitos; os quais foram utilizados separadamente. Na BVS e CAFe CAPES, utilizou-se do artifício de selecionar apenas as produções nacionais, sem restringir idioma, enquanto que no Google Acadêmico por não ter essa opção de busca, foram selecionados como filtros os artigos serem de páginas em português e excluindo a palavra revisão, afim de que as buscas abordassem trabalhos escritos nacionalmente. A busca foi realizada no mês de junho de 2024.

Foram elencados como critérios de inclusão: artigos completos disponíveis integralmente, nas bases de dados elencadas, da área de saúde, experimentais e que utilizassem dos métodos alternativos selecionados. Foram excluídas publicações que não respeitassem a delimitação do tema para área de saúde e não utilizassem dos métodos em experimentos. Todos os artigos que resultaram na busca avançada foram separados para leitura de título e resumo e verificação quanto aos critérios de inclusão, para posterior leitura integral dos selecionados e análise crítica do conteúdo. Além dos artigos obtidos, para entender melhor o contexto atual da questão da experimentação animal e metodologias alternativas, sites e publicações de organizações sem fins lucrativos (ONGs), como a *Humane Society International* (HSI) e governamentais como o Concea e o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação também foram analisados.

## 5.0 RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram coletados ao todo 83 artigos das bases de busca. Houve, então, duas etapas de exclusão baseadas em artigos duplicados, visto que alguns trabalhos abordaram mais de um método alternativo sendo encontrado em mais de uma busca, e a segunda exclusão ocorreu baseado em como os métodos estavam sendo abordados em cada artigo (Figura 04). Por fim, foram selecionados 14 trabalhos para compor essa revisão, como pode ser observado no Quadro 02.

Figura 04: Fluxograma da seleção de artigos a cada etapa de verificação dos critérios de inclusão/exclusão



Fonte: autoral

Foi observado que dos 28 métodos que foram o foco do estudo, apenas 11 foram apresentados nos trabalhos selecionados, os métodos: OECD TG 437, OECD TG 438, OECD TG 431, OECD TG 439, OECD TG 432, OECD TG 428, OECD TG 129, OECD TG 487, reconhecidos pela RN nº 18 (2014), OECD TG 491, OECD TG 492, reconhecidos pela RN nº 31 (2016) e OECD TG 442E, reconhecido pela RN nº 56 (2022). Os trabalhos e métodos relacionados estão descritos no Quadro 02.

Quadro 02: Referências encontradas e os respectivos métodos alternativos utilizados e objetivos

REFERÊNCIA	TÍTULO DO ARTIGO	MÉTODO (S) UTILIZADO	OBJETIVO NO ARTIGO	DESFECHO EXPERIMENTAL
Silva <i>et al.</i> , 2019	Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria	OECD TG 432	Testar a fototoxicidade de pigmentos bacterianos	Avaliação do potencial de fototoxicidade
Andrade <i>et al.</i> , 2020	Innovative strategy based on mechanisms to substitute animal testing for ocular toxicity assessment of agrochemical formulations market in Brazil	OECD TG 437 OECD TG 491	Avaliar e classificar a irritação ocular de formulações agroquímicas com métodos <i>in vitro</i>	Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular
Bezerra <i>et al.</i> , 2020	Application of the adverse outcome pathway framework for investigating skin sensitization potential of nanomaterials using new approach methods	OECD TG 442E	Investigação da imunotoxicidade de nanomateriais amplamente utilizados	Avaliação de sensibilização dérmica
Napoleão-Tavares <i>et al.</i> , 2020	Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism	OECD TG 439	Investigação dos efeitos toxicológicos da fucoxantina	Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele
Tavares <i>et al.</i> , 2020	Toxicity of topically applied drugs beyond skin irritation: Static skin model vs. Two organs-on-a-chip	OECD TG 439	Comparar a irritação cutânea e sistêmica de um fármaco	Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele
Eberlin <i>et al.</i> , 2021	<i>Ex Vivo</i> Human Skin: An Alternative Test System for Skin Irritation and Corrosion Assays	OECD TG 431 OECD TG 439	Uso de fragmentos de pele <i>ex-vivo</i> de cirurgias plásticas eletivas como sistema de teste para a execução dos métodos alternativamente a pele reconstituída	Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele
Scarpin <i>et al.</i> , 2021	Effects of UV-filter Photostabilizers in the Photostability and Phototoxicity of Vitamin A Palmitate Combined with Avobenzone and Octyl Methoxycinnamate	OECD TG 432	Avaliar os efeitos de três fotoestabilizadores de avobenzona	Avaliação do potencial de fototoxicidade
Teixeira <i>et al.</i> , 2021	In Vitro Evaluation of the Photoprotective Potential of Quinolinic Alkaloids Isolated from the Antarctic Marine Fungus <i>Penicillium echinulatum</i> for Topical Use	OECD TG 432	Avaliar a fototoxicidade de frações e compostos isolados do fungo endófito <i>P. echinulatum</i>	Avaliação do potencial de fototoxicidade

Gagosian <i>et al.</i> , 2022	The potencial use of kraft lignins as natural ingredients for cosmetics: Evaluating their photoprotective activity and skin irritation potential	OECD TG 439	Avaliar a irritação cutânea de ligninas kraft	Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele
Geaquinto <i>et al.</i> , 2022	The importance of metrological tools to implementation of alternative method OECD TG 428	OECD TG 428	Analisar fatores que influenciam no teste de absorção cutânea para poder comparar entre estudo e testes, gerando maior confiabilidade nos experimentos	Avaliação da absorção cutânea
Infante <i>et al.</i> , 2022	Safety and efficacy of combined essential oils for the skin barrier properties: In vitro, ex vivo and clinical studies	OECD TG 432	Avaliar a segurança do emprego e os efeitos sinérgicos das associações de óleos essenciais de árvore, lavanda, eucalipto e tangerina na pele com ajuda de estudos <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e clínicos	Avaliação do potencial de fototoxicidade
Ueoka <i>et al.</i> , 2022	Flow cytometry as an alternative method to evaluate genotoxicity of natural cosmetic actives	OECD TG 129	Avaliar o potencial citotóxico, fototóxico e genotóxico dos extratos de <i>Centella asiatica</i> , Castanha da Índia, Hamamélis, Blend, Ecoblend e Cafeína	Avaliação de toxicidade aguda
		OECD TG 432		Avaliação do potencial de fototoxicidade
		OECD TG 487		Avaliação de genotoxicidade
Bagatin <i>et al.</i> , 2023	Bioprinted and manual human epidermis production: A compared performance for skin irritation tests	OECD TG 439	Compara o desempenho de uma epiderme humana bioimpressa (B-RHE) com uma reconstruída manualmente (M-RHE) no teste de irritação cutânea <i>in vitro</i>	Avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele
Choksi <i>et al.</i> , 2024	Retrospective evaluation of the eye irritation potential of agrochemical formulations	OECD TG 437	Avaliação de formulações agroquímicas para determinar se os métodos <i>in vitro</i> poderiam atribuir com precisão as classificações de risco de irritação ocular do Sistema Globalmente Harmonizado das Nações Unidas para Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS)	Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular
		OECD TG 438		
		OECD TG 492		

Fonte: autoral

Visto que a maioria dos testes que foram apresentados em trabalhos são das resoluções mais antigas, pode-se supor que o não aparecimento dos demais é devido ao recém reconhecimento e o país ainda estar se adequando a eles. O mesmo pode ter acontecido para o restante, pois apesar de serem reconhecidos há cerca de uma década, ainda é recente para o Brasil. Além disso, é válido ressaltar que os descritores utilizados buscam apenas pelos códigos de cada método, de maneira que artigos que utilizam dos nomes não foram registados nas buscas. Quando comparamos com os avanços em direção a substituição de experimentos com animais para os métodos alternativo de outros países, vemos que a União Europeia, por exemplo, proibiu a comercialização de produtos cosméticos contendo ingredientes testados em animais em 2013, o que veio acontecer no Brasil apenas em 2023 (Scarpin *et al.*, 2021).

As normativas do CONCEA estabelecem a obrigatoriedade da substituição de ensaios em animais por métodos alternativos, com base no desfecho toxicológico e independentemente da categoria do produto. Os prazos para cumprimento das duas primeiras normas já expiraram. A norma de 2019 exige a adoção dos novos métodos até o final de 2024, enquanto a de 2022 estabelece o prazo de 2027.

Antes de 2019, os métodos *in vivo* eram o padrão da indústria para avaliar desfechos toxicológicos e eram respaldados pela ANVISA. Contudo, estudos científicos demonstram que a extrapolação dos resultados de testes em animais para a espécie humana é limitada, com taxas de erro que podem variar de 50% a quase 100%. Essa discrepância entre modelos animais e humanos reforça a necessidade de desenvolver e implementar métodos alternativos que sejam mais preditivos para a saúde humana (Aguiar *et al.*, 2019).

Assim, com os avanços da ciência e desenvolvimento de métodos alternativos, como os métodos *in vitro*, têm se tornado o melhor caminho a ser seguido. Em comparação com os modelos animais, os métodos *in vitro* apresentam diversas vantagens, como menor custo, maior reprodutibilidade dos resultados e a possibilidade de controlar as variáveis experimentais de forma mais precisa (Ueoka *et al.*, 2022). Além disso, a crescente conscientização sobre o bem-estar animal e as exigências do mercado consumidor têm impulsionado a substituição dos testes em animais por métodos alternativos, contribuindo para o desenvolvimento de produtos cosméticos éticos e inovadores.

Os 14 estudos analisados, abordaram sete desfechos experimentais diferentes utilizando métodos alternativos, entre eles: Avaliação do potencial de irritação e

corrosão da pele – 5 estudos; Avaliação de sensibilização dérmica – 1 estudo; Avaliação da absorção cutânea – 1 estudo; Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular – 2 estudos; Avaliação do potencial de fototoxicidade – 5 estudos; Avaliação de toxicidade aguda – 1 estudo; e Avaliação de genotoxicidade – 1 estudo. 13 estudos abordaram apenas um desfecho e 1 estudo, o de Ueoka *et al.* (2022) abordou três desfechos diferentes: Avaliação do potencial de fototoxicidade; Avaliação de toxicidade aguda; e Avaliação de genotoxicidade (Quadro 02).

Ueoka *et al.* (2022), fez uso de três diferentes diretrizes de métodos alternativos para pesquisar por completo a segurança de extratos de *Centella asiatica*, Castanha da Índia, Hamamélis, Blend, Ecoblend e Cafeína. Utilizou as diretrizes do OECD TG 487 para avaliar genotoxicidade, o qual é usado para determinar se compostos químicos induzem quebras cromossômicas e se há aumento ou diminuição na proliferação de células de mamíferos não tumorais em cultura, sendo de suma importância para as indústrias de desenvolvimento. O OECD TG 129 foi utilizado para avaliar a citotoxicidade. Esse ensaio busca avaliar o impacto de substâncias químicas nas células, identificando alterações em processos vitais como proliferação e viabilidade. O teste determina parâmetros como IC<sub>50</sub> e IC<sub>10</sub>, que indicam a concentração necessária para inibir o crescimento celular em 50% e 10%, respectivamente, além de estimar a DL<sub>50</sub>, a dose letal para 50% das células, única diretriz *in vitro* reconhecida para avaliação de toxicidade aguda.

Além dessas duas diretrizes, Ueoka *et al.* (2022) também fez uso do OECD TG 432, o qual foi um dos mais abordados nos estudos selecionados. Esse método visa avaliar o potencial de fototoxicidade, desfecho também estudado por Silva *et al.* (2019), Scarpin *et al.* (2021); Teixeira *et al.* (2021), e Infante *et al.* (2022). A fototoxicidade é uma resposta aguda da pele causada por substâncias fotorreativas na presença de luz solar, que pode ser categorizada como fotoirritação, fotoalergia e fotogenotoxicidade (Scarpin *et al.*, 2021; Infante *et al.*, 2022).

A fotocitotoxicidade é avaliada pela redução da viabilidade celular após exposição à amostra sob condições de iluminação. A comparação entre a viabilidade celular na presença e na ausência de luz permite identificar substâncias com potencial fototóxico. Substâncias que apresentam fototoxicidade *in vitro* podem induzir reações adversas em organismos vivos, especialmente após aplicação tópica ou sistêmica, devido à exposição à luz solar ou a fontes de luz artificiais (Silva *et al.*, 2019; Ueoka *et al.*, 2022). Quando acontece um resultado positivo para fototoxicidade, são

necessários mais testes para classificar a substância corretamente, principalmente em modelos 3D para simular a penetração na pele *in vivo* (Teixeira *et al.*, 2021; Infante *et al.*; 2022).

O OECD 432 é um ensaio biológico inicial crucial para a predição da fotosegurança de substâncias. Quando um composto é classificado como 'sem potencial fototóxico' nesse teste, devido à sua alta sensibilidade, considera-se que não há necessidade de realizar testes adicionais, pois a ausência de fototoxicidade é considerada demonstrada (Scarpin *et al.*, 2021; Teixeira *et al.*, 2021). Caso contrário, como dito anteriormente, novos testes devem ser realizados, visto que estudos com algumas metodologias *in vitro*, como as culturas de células, devido à maior sensibilidade e avaliação direta em cultura de células, podem ser limitados, além disso, é um sistema básico simples em comparação com a arquitetura tridimensional da pele que envolve conexões e interações entre diferentes tipos de células e matriz extracelular (Silva *et al.*, 2019; Infante *et al.*, 2022).

Assim, é importante utilizar outras metodologias em conjunto, como no estudo de Ueoka *et al.* (2022), e/ou diferentes níveis de testes (monocamadas *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*), como no estudo de Infante *et al.* (2022), que retrata que foi importante para melhor acessar a segurança e discutir a eficácia em diferentes concentrações e combinações, para compreender melhor o comportamento de alguns compostos na barreira da pele. A substância pode ser citotóxica de acordo com a concentração utilizada, mas sua permeação através do extrato córneo pode ser limitada (Silva *et al.*, 2019; Infante *et al.*, 2022).

Já a avaliação da toxicidade ocular e cutânea pode ser também realizada *in vivo* por meio do teste de Draize, utilizado há mais de 80 anos, conforme a Diretriz de Teste do OCDE nº 405. Nesse teste, são pontuados os danos à pele, córnea, conjuntiva e íris, a fim de classificar o potencial de irritação ou corrosão ocular. No entanto, é importante destacar que esse método não passou por um processo oficial de validação e mostrou-se pouco confiável na previsão da toxicidade ocular de produtos químicos em humanos, devido a variações entre observadores e entre os animais, o que compromete a reprodutibilidade, especialmente para irritantes oculares leves e moderados (Andrade *et al.*, 2020; Gagorian *et al.*, 2022; Choksi *et al.*, 2024).

É consenso que modelos *in vitro* isolados apresentam limitações na predição exata de resultados observados *in vivo*, sendo esperadas variações inter-modelos. Entretanto, métodos *in vitro* se mostraram tão relevantes quanto modelos animais

para prever efeitos oculares em humanos. Diante disso, Andrade *et al.* (2020) e Choksi *et al.* (2024), após testarem formulações seguindo as diretrizes do OECD TG 437, 438, 491 e 492, para a avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular, no geral, esses estudos sugeriram que os métodos de teste *in vitro* podem ser usados para identificar formulações agroquímicas que não exigem classificação para irritação ocular, independentemente do tipo de formulação e acharam discrepâncias entre a classificação inicial da ANVISA e os resultados obtidos em seus estudos.

Os resultados de Choksi *et al.* (2024) mostram que aproximadamente 70% das formulações agroquímicas registradas receberam a classificação de risco não classificada para irritação ocular de acordo com o sistema de classificação do GHS, dos quais os testes poderiam ser realizados *in vitro*, levando a uma redução significativa do uso de animais. No estudo de Andrade *et al.* (2020), as formulações que foram classificadas como irritantes graves foram classificadas no esquema ANVISA, que utilizou resultados *in vivo* pelo Teste de Draize, como moderadamente ou levemente irritantes, refletindo a importância de adotar a GHS e padronizar as classificações. A implementação do sistema GHS pela ANVISA demonstrou a relevância desse sistema internacional para a harmonização da classificação toxicológica de agrotóxicos no Brasil (Andrade *et al.*, 2020). A reclassificação realizada evidencia que a adoção de critérios padronizados pode levar a uma avaliação mais precisa e consistente dos riscos associados a esses produtos, corroborando com os estudos.

Geaquinto *et al.* (2022) também discutem sobre a padronização dos resultados. Abordam em seu estudo, o qual retratou sobre o uso de ferramentas metrológicas para avaliar e comparar resultados da avaliação da absorção cutânea, que se tornou um desafio comparar os resultados de diferentes laboratórios devido à grande variabilidade das condições experimentais. Mesmo que se discuta muito na literatura sobre absorção cutânea, não há padronização tornando difícil a comparação e uniformização de resultados entre laboratórios.

Além do potencial de irritação e corrosão ocular, há também os métodos reconhecidos para avaliar o potencial de irritação e corrosão da pele, muito utilizados pela indústria cosmética. O uso de produtos cosméticos eficazes é particularmente importante para manter a fisiologia da pele e melhorar a função de barreira e a hidratação da pele, prevenindo alterações cutâneas relacionadas ao ressecamento. O Brasil, na pesquisa da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal,

Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC) (2024), ficou em terceiro lugar no Top 10 Mercados Consumidores de 2023 do Panorama do setor 2024 de produtos de higiene e cosméticos (Figura 05). A trajetória do mercado de cosméticos brasileiro se mostra crescente, conseqüentemente, há um aumento também do número de testes realizados para garantia da qualidade do produto e segurança de quem faz uso.

Figura 05: O Brasil no mundo – Dados ao Consumidor – 2023



Fonte: ABIHPEC, 2024

O teste de irritação cutânea *in vitro* é uma ferramenta essencial para avaliar o potencial corrosivo de substâncias químicas, conforme definido pelo GHS da ONU. Ao analisar características como a morfologia da pele, a função de barreira e a viabilidade celular, esse teste contribui para a avaliação da segurança de produtos químicos e a prevenção de danos cutâneos irreversíveis irritantes (Eberlin *et al.*, 2021; Bagatin *et al.*, 2023). Os estudos de Napoleão-Tavares *et al.* (2020), Tavares *et al.* (2020), Eberlin *et al.* (2021), Gagosian *et al.* (2022) e Bagatin *et al.* (2023) abordaram diretrizes que têm como desfecho a avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele.

Napoleão-Tavares *et al.* (2020), Tavares *et al.* (2020), Gagosian *et al.* (2022) e Bagatin *et al.* (2023) trataram de criar novos protocolos ou modelos de pele para verificar os efeitos irritantes ou não-irritantes de substâncias.

- Napoleão-Tavares *et al.* (2020): desenvolve um modelo de epiderme humana reconstituída, compatível com aplicações de órgão em um chip, para avaliar os efeitos

tóxicos da fucoxantina;

- Tavares *et al.* (2020): estuda um sistema com um modelo de pele que imita a morfologia da pele humana em um circuito microfisiológico associado a um modelo de fígado para comparar os eventos de toxicidade após a exposição tópica e sistêmica de substâncias, uma vez que a avaliação hepatotóxica adicional fornece uma imagem mais clara da toxicidade;

- Gagosian *et al.* (2022): testou uma nova técnica de pele que demonstrou boa previsibilidade geral na classificação de irritantes e não irritantes para a pele, garantindo a qualidade dos dados de irritação, além de se assemelhar a epiderme humana;

- Bagatin *et al.* (2023): estabeleceu um protocolo adaptado para bioimpressão de uma metodologia manual de epiderme humana reconstruída, mostrando que essa tecnologia pode influenciar no sistema de dispersão, devendo ter atenção sobre isso e conhecimento de tais efeitos.

A engenharia de tecidos oferece uma alternativa ética e mais precisa à experimentação animal. Ao criar modelos de tecidos humanos *in vitro*, é possível avaliar a eficácia e a segurança de produtos de forma mais precisa e relevante para a saúde humana.

Em contrapartida aos modelos reconstituídos, Eberlin *et al.* (2021), discute sobre o uso de pele *ex-vivo*, ainda mais no Brasil que a disponibilidade de tecidos não é uma limitação ao uso de pele humana nativa como modelo *in vitro*. Enquanto o excedente rotineiramente descartado como resíduos infecciosos, seu uso constitui um modelo alternativo viável e sustentável. A pele nativa, segundo o EUCVAM, é um modelo atrativo para estudos *in vitro*, pois preserva a complexidade da pele humana, confluindo com os resultados do estudo, segundo os autores, que indicam que o uso de fragmentos de pele *ex vivo* padronizados fornece uma classificação equivalente àquela obtida com as diretrizes recomendadas da OECD, permitindo que este modelo seja considerado uma opção potencial para uso nessas avaliações de segurança.

Bezerra *et al.* (2020), que retrataram dados que auxiliam na compreensão dos efeitos adversos relacionados a nanomateriais para a saúde humana com o uso do OECD TG 442E, refletem que embora os testes em animais tenham sido o padrão para avaliação de riscos, uma combinação de métodos não animais tem mostrado resultados promissores e alta capacidade preditiva. Apesar de suas limitações, os métodos não animais representam uma alternativa promissora para substituir os

testes em animais.

Ademais, as últimas atualizações de legislação nacional sobre proibição de uso de animais em testes e o reconhecimento de novos métodos alternativos no Brasil geram um impacto significativo em diversos setores da indústria, incluindo cosméticos, químicos, agroquímicos e farmacêuticos. Disner (2019), aborda a falta de treinamento e preparação dos pesquisadores, entretanto, o CONCEA e a ANVISA, buscam difundir o conhecimento sobre esses métodos. Além disso, há a Plataforma Regional de Métodos Alternativos (PReMASUL), vinculada ao MERCOSUL, que promove a capacitação de recursos humanos em métodos alternativos, com cursos teóricos e práticos realizados em laboratórios de referência como a Renama (INCQS-Fiocruz, Inmetro e LNBio/CNPEM) e em laboratórios parceiros (públicos ou privados) (Eberlin *et al.*, 2019).

A difusão do assunto e conhecimento do mesmo, além do desenvolvimento atual constante de novas metodologias alternativas, facilitarão a transição dos testes em animais para os métodos alternativos, auxiliando na construção de conhecimento nas áreas de saúde, cosméticos, higiene, agroquímicos, com abordagens mais seguras e menos cruéis.

## 6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente revisão sistemática demonstrou a crescente adoção de métodos alternativos aos testes em animais para a avaliação de segurança de produtos químicos, especialmente no contexto brasileiro. Os 14 estudos analisados evidenciaram a diversidade de métodos *in vitro* disponíveis e sua aplicação em diferentes áreas, como a avaliação de irritação cutânea e ocular, fototoxicidade, genotoxicidade e absorção cutânea. Os resultados obtidos nos estudos analisados demonstram a relevância e a confiabilidade dos métodos alternativos *in vitro* para a predição da segurança de produtos químicos, corroborando com as diretrizes da OECD e as regulamentações nacionais, principalmente quando utilizados em conjunto para confirmar os resultados.

A substituição gradual dos testes em animais por métodos *in vitro* traz diversos benefícios, como a redução do sofrimento animal, a obtenção de resultados mais precisos e reproduzíveis, e a diminuição dos custos associados à pesquisa. No entanto, a implementação total dos métodos alternativos ainda enfrenta desafios, como a necessidade de maior padronização dos protocolos, a qualificação de pessoal e a atualização das infraestruturas laboratoriais. Além disso, a resistência cultural e a falta de conhecimento sobre as vantagens dos métodos alternativos podem dificultar sua adoção em alguns setores, situação que só vai ser revertida com a persistência na divulgação dos métodos e desenvolvimentos de estudos comprovando sua eficácia.

É fundamental destacar que o Brasil possui um grande potencial para se tornar um líder na área de métodos alternativos, considerando a sua vasta rede de instituições de pesquisa e a crescente demanda por produtos seguros e éticos. Ao investir em métodos alternativos, o país não apenas fortalecerá sua produção científica, mas também contribuirá para o desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes para a população, além de promover o bem-estar animal. A otimização da importação de insumos e a padronização dos protocolos são passos essenciais para alcançar esse objetivo.

A criação de políticas públicas que incentivem o desenvolvimento e a validação de novos métodos, juntamente com a capacitação de profissionais e a disseminação de informações sobre as vantagens dos métodos alternativos, são medidas essenciais para acelerar essa transição. Em conclusão, os resultados desta revisão demonstram

que os métodos alternativos aos testes em animais representam uma alternativa promissora e ética para a avaliação da segurança de produtos químicos. A adoção desses métodos contribui para o avanço da ciência, a proteção da saúde humana e o cuidado com os animais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACRE. (2021). Lei nº 3.797, de 28 de outubro de 2021. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, higiene pessoal, perfumes, limpeza e seus componentes, no Estado, sem prejuízo de proibições e sanções previstas em outros dispositivos legais. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://www.al.ac.leg.br/leis/wp-content/uploads/2021/11/Lei3.797-1.pdf>>. Acesso em: 25 de agosto de 2024
- AGUIAR, A.C.C.S; SERRA, E.S.; AGUIAR, O.L.C.S; SILVA, T.T.A. Um estudo sobre a utilização dos animais em pesquisas científicas no Brasil. **Revista Latino-Americana de Direitos da Natureza e dos Animais**, v2, n.2, p.04-07, 2019. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/342534791\\_Um\\_estudo\\_sobre\\_a\\_utilizacao\\_dos\\_animais\\_em\\_pesquisas\\_cientificas\\_no\\_Brasil\\_Revista\\_Latino-Americana\\_de\\_Direito\\_da\\_Natureza\\_e\\_dos\\_Animais](https://www.researchgate.net/publication/342534791_Um_estudo_sobre_a_utilizacao_dos_animais_em_pesquisas_cientificas_no_Brasil_Revista_Latino-Americana_de_Direito_da_Natureza_e_dos_Animais)>. Acesso em: 15 de junho de 2024.
- AMAZONAS. (2015). Lei Promulgada nº 289, de 03 de dezembro de 2015. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes no Estado do Amazonas, e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://sapl.al.am.leg.br/norma/9412#:~:text=PRO%C3%8DBE%20a%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20animais,Amazonas%2C%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%A2ncias.>>. Acesso em: 01 de agosto de 2024.
- ANDRADE, P.E.G.; ELISIÁRIO, P.B.; XAVIER, R.S.; SENA, D.R.C. Testes de fármacos e cosméticos em animais e suas implicações éticas. **Revista Desafios**, v.01, n.01, p.132-144, 2023. DOI: <<http://dx.doi.org/10.20873/ufv1n123-13751>>. Acesso em: 06 de junho de 2024.
- ANDRADE, W.M; SILVA, A.C.G; MOREIRA, L.C.; GOMES, T.R.L.S.; BATISTA, A.C.; VALADARES, M.C. Innovative strategy based on mechanisms to substitute animal testing for ocular toxicity assessment of agrochemical formulations market in Brazil. **Toxicology in Vitro**, v.66, 2020. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104851>>. Acesso em: 09 de julho de 2024.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2012). **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. 2. Ed. Brasília. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf/view>>.
- Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC). Panorama do setor 2024. **A Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos**. Disponível em: <[https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2024/02/Panorama-do-Setor\\_Atualizado\\_05.09.24\\_Port.pdf](https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2024/02/Panorama-do-Setor_Atualizado_05.09.24_Port.pdf)>, Acesso em: 09 de julho de 2024.
- BAGATIN, J.T.; CAMARENA, D.E.M.; OSAKI, L.H.; FREITAS, V.M.; SILVA, R.O.;

NOLD, J.C.L.; MARIA-ENGLER, S.S. Bioprinted and manual human epidermis production: A compared performance for skin irritation tests. **Bioprinting**, v.29, 2023. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00251>>. Acesso em: 10 de julho de 2024.

BEZERRA, S.F.; RODRIGUES, B.S.; SILVA, A.C.G.; ÁVILA, R.I.; BRITO, H.R.G.; CINTRA, E.R.; VELOSO, D.F.M.C.; LIMA, E.L.; VALADARES, M.C. Application of the adverse outcome pathway framework for investigating skin sensitization potential of nanomaterials using new approach methods. **Contact Dermatitis**, v.84, p.67-74, 2021. DOI: <10.1111/cod.13669>. Acesso em: 10 de julho de 2024.

BRASIL. Lei Nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União** de 13 de fevereiro de 1998, Seção 1, Pág. 1, 1998. Disponível em: <[https://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/l9605.htm](https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9605.htm)>. Acesso em: 01 de agosto de 2024.

BRASIL. (2008). Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do parágrafo 1º do artigo 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União** de 9 de outubro de 2008, Seção 1, Pág. 8. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 01 de agosto de 2024.

BRASIL. (2009). *Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009*. Dispõe sobre a composição do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, estabelece as normas para o seu funcionamento e de sua Secretaria-Executiva, cria o Cadastro das Instituições de Uso Científico de Animais - CIUCA, mediante a regulamentação da Lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008, que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União** de 16 de julho de 2009, Seção 1, Pág. 2. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6899.htm)>. Acesso em: 01 de agosto de 2024.

BRASIL. (2023). Resolução nº 58, de 24 de fevereiro de 2023. Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências. **Diário Oficial da União** de 01 de março de 2023, edição 41, seção 1, pág. 8. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-58-de-24-de-fevereiro-de-2023-466792333>> Acesso em: 01 de agosto de 2024.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos – Renama. **Diário Oficial [da] União**. 2012 jul.

CHOKSI, N.; LATORRE, A.; CATALANO, S.; GRIVEL, A.; BALDASSARI, J.; PIRES, J.; CORVARO, M.; SILVA, M.; OGASAWARA, M.; INFORZATO, M.; HABE, P.; MURATA, R.; STINCHCOMBE, S.; KOLLE, A.N.; MASINJA, W.; PERJESSY, G.;

DANIEL, A.; ALLEN, D. Retrospective evaluation of the eye irritation potential of agrochemical formulations. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.146, 2023. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105543>>. Acesso em: 11 de julho de 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2014). **Resolução Normativa Nº 18**, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. **Diário Oficial da União** de 25 de setembro de 2014, Seção 1, Pág. 9. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-18-de-24-de-setembro-de-2014.pdf>>. Acesso em: 19 de julho de 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2016). Resolução Normativa Nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União** de 19 de agosto de 2016, Seção 1, Pág. 4. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-31-de-18-de-agosto-de-2016.pdf>>. Disponível em: 19 de julho de 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2019). Resolução Normativa Nº 45, de 22 de outubro de 2019. Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União** de 25 de outubro de 2019, Seção 1, Pág. 14. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-45-de-22-de-outubro-de-2019.pdf>>. Disponível em: 19 de julho de 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2022a). Resolução Normativa Nº 56, de 5 de outubro de 2022. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União** de 7 de outubro de 2022, Seção 1, Pág. 15. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-56-de-5-de-outubro-de-2022-434544861>>. Disponível em: 19 de julho de 2024.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. (2022b). Resolução Normativa Nº 54, de 10 de janeiro de 2022. Dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica e dá outras providências. **Diário Oficial da União** de 17 de janeiro de 2022, Seção 1, Pág. 18. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-normativa-concea-n-54-de-10-de-janeiro-de-2022-374148642>>. Disponível em: 19 de julho de 2024.

DANTAS, H.L.L.; COSTA, C.R.B.; COSTA, L.M.C.; LÚCIO, I.M.L.; COMASSETTO, I. Como elaborar uma revisão integrativa: Sistematização do método científico. **Revista científica de enfermagem**, v.12, p.334-345, 2021. DOI: <<https://doi.org/10.24276/rrecien2022.12.37.334-345>>. Acesso em: 10 de ago de 2024.

DISNER, G.R. Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. **Evidência: Biociências, saúde e inovação**. v. 19, n. 2, p. 259-274, jul./dez. 2019. DOI: <<https://doi.org/10.18593/eba.v19i2.20964>>. Acesso em: 03 de junho de 2024.

DISTRITO FEDERAL. (2020). Lei nº 6.721, de 23 de novembro de 2020. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <[EBERLIN, S.; FACCHINI, G.; SILVA, G.H.; EBERLIN, S.; BRAGATTO, A.R.; PINHEIRO, A.L.T.A.; PINHEIRO, A.S. \*Ex Vivo\* Human Skin: An Alternative Test System for Skin Irritation and Corrosion Assays. \*\*Alternatives to Laboratory Animals\*\*, v.49, n.4, p.137-146, 2021. DOI: <10.1177/02611929211038652>. Acesso em: 10 de julho de 2024.](https://www.sinj.df.gov.br/sinj/Norma/7fed4d5953b840a68005e4f7e4afdbca/Lei_6721_2020.html#:~:text=LEI%20N%C2%BA%206.721%2C%20DE%2023%20DE%20NOVEMBRO%20DE%202020&text=Pro%C3%ADbe%20a%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20animais,componentes%20e%20d%C3%A1%20outras%20provid%C3%A2ncias.></a>>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.</p></div><div data-bbox=)

EBERLIN, S.; da SILVA, M.S; FACCHINI, G.; da SILVA, G.H; PINHEIRO, A.L.T.A.; da SILVA PINHEIRO, A. Métodos Alternativos para Avaliação de Segurança de Produtos no Brasil, **Cosmetics & Toiletries**, v.31, p.18-28, 2019. Disponível em: <[www.cosmeticsonline.com.br](http://www.cosmeticsonline.com.br)> Acesso em: 05 de junho de 2024.

ESPÍRITO SANTO. (2021). Lei nº 11.325, de 12 de julho de 2021. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, higiene pessoal, perfumes, limpeza e seus componentes no âmbito do Estado do Espírito Santo, e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://www3.al.es.gov.br/Arquivo/Documents/legislacao/html/LEI113252021.html>>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.

GAGOSIAN, V.S.C.; CLARO, F.C.; SCHWARZER, A.C.A.P.; CRUZ, J.V.; THÁ, E.L.; TRINDADE, E.S.; MAGALHÃES, W.L.E.; PESTANA, C.B.; LEME, D.M. The potential use of kraft lignins as natural ingredients for cosmetics: Evaluating their photoprotective activity and skin irritation potential. **Biological Macromolecules**, v.222, 2022. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.037>>. Acesso: 09 de julho de 2024.

GEAQUINTO, L.R.O.; SOUZA, V.; REGO, E.C.P.; SILVA, M.L.; BALOTTIN, L.B.L. The importance of metrological tools to implementation of alternative method OECD TG 428. **Toxicology in Vitro**, v.84, 2022. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2022.105425>>. Acesso em: 12 de julho de 2024.

HUMANE SOCIETY INTERNATIONAL. **Humane Society International**. Disponível em: <<https://www.hsi.org/>>. Acesso em: 25 de agosto de 2024

INFANTE, V.H.P.; CAMPOS, P.M.B.G.M.; GASPAR, L.R.; DARVIN, M.E.;

SCHLEUSENER, J.; RANGEL, K.C.; MEINKE, M.C.; LADEMANN, J. Safety and efficacy of combined essential oils for the skin barrier properties: In vitro, ex vivo and clinical studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v.44, p.118-130, 2022. DOI: <10.1111/ics.12761>. Acesso em: 15 de julho de 2024.

MATO GROSSO. (2023). Lei nº 12.316, de 07 de novembro de 2023. Proíbe a utilização de animais para o desenvolvimento de experimentos e testes em produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes no Estado do Mato Grosso. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://legislacao.mt.gov.br/mt/lei-ordinaria-n-12316-2023-mato-grosso-proibe-a-utilizacao-de-animais-para-o-desenvolvimento-de-experimentos-e-testes-em-produtos-cosmeticos-de-higiene-pessoal-perfumes-e-seus-componentes-no-estado-do-mato-grosso?origin=instituicao>>. Acesso em: 26 de julho de 2024.

MATO GROSSO DO SUL. (2014). Lei nº 4.538, de 03 de junho de 2014. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://faolex.fao.org/docs/pdf/bra136157.pdf>>. Acesso em 24 de agosto de 2024.

MINAS GERAIS. (2015). Lei nº 23.050, de 25 de julho de 2018. Proíbe a utilização, no Estado, de animais para desenvolvimento, experimento e teste de perfumes e produtos cosméticos e de higiene pessoal e seus componentes. **Diário do Legislativo**. Disponível em: <[MONTEIRO, A.C.; SILVA, A.C. Ciência e Sociedade: uma revisão da abordagem ética nas questões de experimentação animal. \*\*Ciência Animal e veterinária: Inovações e tendências\*\*. v. 1, p. 73-95, 28 de dez. de 2021. DOI: <10.37885/211106750>. Acesso em: 01 de junho de 2024.](https://www.almg.gov.br/legislacao-mineira/LEI/23050/2018/#:~:text=Pro%C3%ADbe%20a%20utiliza%C3%A7%C3%A3o%2C%20no%20Estado,higiene%20pessoal%20e%20seus%20componentes.></a>>. Acesso em: 19 de julho de 2024.</p></div><div data-bbox=)

MORETTO, L. D.; STEPHANO, M. A. **Métodos alternativos ao uso de animais em pesquisa reconhecidos no Brasil**. [S.l.]: [s.n.], 2019.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Test Guidelines Programme for the testing of chemicals**. Disponível em: <[www.oecd-ilibrary.org](http://www.oecd-ilibrary.org)>. Acesso em: 10 de julho de 2024.

PARÁ. (2016). Lei nº 8.361, de 11 de maio de 2016. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <[https://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-8361-2016-pa\\_320483.html](https://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-8361-2016-pa_320483.html)>.

PARAÍBA. (2022). Lei nº 12.310 de maio de 2022. Veda a utilização de animais no desenvolvimento, experimento e testes de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://auniao.pb.gov.br/servicos/doe/2022/junho/diario-oficial-02-06-2022.pdf>>. Acesso em 25 de agosto de 2024.

PARANÁ. (2023). Lei nº 21.657, de 27 de setembro de 2023. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento de experimentos e testes de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes, e testes de laboratório da indústria do tabaco. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <[https://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-21657-2023-pr\\_450136.html](https://www.normasbrasil.com.br/norma/lei-21657-2023-pr_450136.html)>. Acesso em: 20 de julho de 2024.

PEDRO, D.A. Métodos alternativos ao uso de animais em ensino e pesquisa: Evolução e panorama atual do Brasil. **Enciclopédia Biosfera**, v.18, n.37, p.334-348, 2021. DOI: <10.18677/EnciBio\_2021C28>. Acesso em: 05 de junho de 2024.

PEDRO, D.A.; BENTO, T.F.M.; Legislação sobre alternativas à experimentação animal e métodos reconhecidos entre 2014 e 2022 no Brasil. **Pubvet: Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.17, n.4, p.1-6, 2023. DOI: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v17n4e1375>>. Acesso em: 05 de junho de 2024.

PERNAMBUCO. (2018). Lei nº 16.498, de 6 de dezembro de 2018. Altera a Lei nº 15.226, de 7 de janeiro de 2014, que institui o Código Estadual de Proteção aos Animais, no âmbito do Estado de Pernambuco, para proibir a utilização de animais durante o desenvolvimento, experimento e teste de cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal e de limpeza, e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://legis.alepe.pe.gov.br/texto.aspx?id=41219>>. Acesso em: 21 de julho de 2024.

PRADO, R.A.A.; BIZAWU, K. O uso dos selos *Cruelty-Free* pela indústria de cosméticos. **Dom Helder Revista de Direito**, v.6, e062563, p1-22, 2023. DOI: <<http://dx.doi.org/10.36598/dhrd.v6.2563>>. Acesso em: 06 de junho de 2023.

PRESGRAVE, O.A.F. The need for the Establishment of a Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **ATLA**. v.36, p. 705-708, 2008. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/026119290803600613?icid=int.sj-abstract.similar-articles.1>>. Acesso em: 01 de junho de 2024.

PRESGRAVE, O.; ESKES, C.; PRESGRAVE, R.; ALVES, E.; FREITAS, J.C.; CALDEIRA, V.; GIMENES, I.; SILVA, R.; NOGUEIRA, S.; NUNES, J.; RIVERA, E.; SÁ-ROCHA, V.; COECKE, S.; HARTUNG, T. A Proposal to Establish a Brazilian Center for Validation of Alternative Methods (BraCVAM). **ATLEX**, 2010. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/figure/Proposed-structure-for-the-Brazilian-Centre-on-Alternative-Test-Methods\\_fig1\\_249335340](https://www.researchgate.net/figure/Proposed-structure-for-the-Brazilian-Centre-on-Alternative-Test-Methods_fig1_249335340)>. Acesso em: 04 de junho de 2024.

PRESGRAVE, O.; MOURA, W.; CALDEIRA, C.; PEREIRA, E.; BÔAS, M.H.V.; ESKES, C. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the Process of Validation in Brazil. **ATLA**, v.44, p.85-90, 2016. DOI: <<https://doi.org/10.1177/026119291604400110>>. Acesso em: 05 de junho de 2024.

RIO DE JANEIRO. (2017) Lei nº 7.814, de 15 de dezembro de 2017. PROÍBE A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA DESENVOLVIMENTO, EXPERIMENTOS E TESTES DE PRODUTOS COSMÉTICOS, HIGIENE PESSOAL, PERFUMES, LIMPEZA E SEUS COMPONENTES, NO ÂMBITO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, SEM PREJUÍZO DE PROIBIÇÕES E SANÇÕES PREVISTAS EM OUTROS DISPOSITIVOS LEGAIS: MUNICIPAL, ESTADUAL OU FEDERAL, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. **Assembleia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://alerjln1.alerj.rj.gov.br/CONTLEI.NSF/c8aa0900025feef6032564ec0060dfff/004d830341147e03832581fb005bfbf9?OpenDocument>>. Acesso em: 16 de julho de 2024.

RIO GRANDE DO NORTE (2023). Lei nº 11.617, de 04 de dezembro de 2023. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimentos e teste de produtos cosméticos, de higiene pessoal, perfumes e seus componentes no Estado do Rio Grande do Norte e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <<https://www.al.rn.leg.br/storage/legislacao/2023/lkpwl6yc0soi6o6j27bpjhotbjfdaz.pdf>>. Acesso em: 10 de agosto de 2024.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L.. *Os Princípios da Técnica Experimental Humana*, 238pp, 1959.

SCARPIN, M.S.; KAWAKAMI, C.M.; RANGEL, K.C.; PEREIRA, K.C.; BENEVENUTO, C.G.; GASPAR, L.R. Effects of UV-filter Photostabilizers in the Photostability and Phototoxicity of Vitamin A Palmitate Combined with Avobenzone and Octyl Methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v.97, p.700-709, 2021. DOI: <10.1111/php.13407>. Acesso em: 16 de julho de 2024.

SANTA CATARINA. (2020). Lei nº 18.009, de 6 de outubro de 2020. Veda a utilização de animais no desenvolvimento, experimento e testes de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <[http://leis.alesc.sc.gov.br/html/2020/18009\\_2020\\_lei.html#:~:text=LEI%20N%C2%BA%2018.009%2C%20DE%206%20DE%20OUTUBRO%20DE%202020&text=Fonte%3A%20ALESC%2FGCAN.,higiene%20pessoal%2C%20cosm%C3%A9ticos%20e%20perfumes.>](http://leis.alesc.sc.gov.br/html/2020/18009_2020_lei.html#:~:text=LEI%20N%C2%BA%2018.009%2C%20DE%206%20DE%20OUTUBRO%20DE%202020&text=Fonte%3A%20ALESC%2FGCAN.,higiene%20pessoal%2C%20cosm%C3%A9ticos%20e%20perfumes.>)>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.

SANTOS, E.J.R.; ASSIS, L.S.; LIMA, M.P.D; MURATORI, M.C.S.M; SANTOS, N.P.S. Uso de animais na experimentação animal: Revisão. **Pubvet: Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 09, p. 1-8, set. 2021. DOI: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n09a910.1-8>>. Acesso em: 03 de junho de 2024.

SÃO PAULO. (2014). Lei nº 15.316, de 23 de janeiro de 2014. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado**. Disponível em: <>. Acesso em: 25 de agosto de 2024.

SILVA, C.C.; SAVIAN, C.M.; PREVEDELLO, B.P.; AMBERLAN, C.; DALPIAN, D.M.; SANTOS, B.Z. Acesso e utilização de serviços odontológicos por gestantes: revisão

integrativa de literatura. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.25, p.827-835, 2020. DOI: <<https://doi.org/10.1590/1413-81232020253.01192018>>. Acesso em: 01 de agosto de 2024.

SILVA, T.R.; TAVARES, R.S.N.; CANELA-GARAYOA, R.; ERAS, J.; RODRIGUES, M.V.N.; NERI-NUMA, I.A.; PASTORÉ, G.M.; ROSA, L.H.; SCHLTZ, J.A.A.; DEBONSI, H.M.; CORDEIRO, L.R.G.; OLIVEIRA, V.M. Chemical Characterization and Biotechnological Applicability of Pigments Isolated from Antarctic Bacteria. **Marine Biotechnology**, v.21, p.416–429, 2019. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s10126-019-09892-z>>. Acesso em: 11 de julho de 2024.

TAVARES, R.S.N.; MARIA-ENGLER, S.S.; COLEPICOLO, P.; DEBONSI, H.M.; SCHÄFER-KORTING, M.; MARX, U.; GASPAR, L.R.; ZOSCHKE, C. Skin Irritation Testing beyond Tissue Viability: Fucoxanthin Effects on Inflammation, Homeostasis, and Metabolism. **Pharmaceutics**, v.12, 2020. DOI: <[10.3390/pharmaceutics12020136](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020136)>. Acesso em: 08 de julho de 2024.

TAVARES, R.S.N.; TAO, T.P.; MASCHMEYER, I.; MARIA-ENGLER, S.S.; SCHÄFER-KORTING, M.; WINTER, A.; ZOSCHKE, C.; LAUSTER, R.; MARX, U.; GASPAR, L.R. Toxicity of topically applied drugs beyond skin irritation: Static skin model vs. Two organs-on-a-chip. **International Journal of Pharmaceutics**, v.589, 2020. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119788>>. Acesso em: 19 de julho de 2024.

TEIXEIRA, T.R.; RANGEL, K.C.; TAVARES, R.S.N.; KAWAKAMI, C.M.; SANTOS, G.S.; MARIA-ENGLER, S.S.; COLEPICOLO, P.; GASPAR, L.R.; DEBONSI, H.M. In Vitro Evaluation of the Photoprotective Potential of Quinolinic Alkaloids Isolated from the Antarctic Marine Fungus *Penicillium echinulatum* for Topical Use. **Marine Biotechnology**, v.23, p.357-372, 2021. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s10126-021-10030-x>>. Acesso em: 15 de julho de 2024.

UEOKA, A.R.; SUFI, B.S.; MAGALHÃES, W.V.; FERNANDES, L.; ANDREO-FILHO, N.; LEITE-SILVA, V.R.; LOPES, P.S. Flow cytometry as an alternative method to evaluate genotoxicity of natural cosmetic actives. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.22, p.958-968, 2023. DOI: <[10.1111/jocd.15473](https://doi.org/10.1111/jocd.15473)>. Acesso em: 15 de julho de 2024.